

Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen
lichtbedingten Phosphat - Spiegel - Veränderungen
und Photosynthese - Prozessen in *Chlorella vulgaris*

Wolfgang G. A. Klob

1972
—

Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen
lichtbedingten Phosphat - Spiegel - Veränderungen
und Photosynthese - Prozessen in *Chlorella vulgaris*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Wolfgang G. A. Klob
aus
Augsburg

April 1972



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Tanner

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 6. 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	16
1. Algenmaterial und Anzucht der Algen	16
2. Versuchsvorbereitung und Algen- dichte	17
3. Messung des Phosphatabfalls und apparativer Aufbau	17
4. Methoden der Phosphatbestimmung	19
4.1. Optischer Test nach Robison und Martland	19
4.2. Optischer Test nach King	19
4.3. Optischer Test nach Chen, Toribara und Warner	20
4.4. Vergleich der Testverfahren	20
5. Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung	23
6. Messung des O_2 -Gaswechsels	24
7. Messung der Glucoseassimilation	25
7.1. Induktion des Aufnahmesystems	25
7.2. Versuchsdurchführung	25
7.3. Zuckerbestimmung nach Folin und Wu	26
7.4. Aufnahme von Glucose-(U)- ^{14}C	26
7.5. Messung der Glucoseassimila- tion im Warburg-Apparat	27
8. Messung der Gärung	28
9. Nachweis von Ribulose-1,5-diphos- phat	29
9.1. Versuchsdurchführung und Algen- extraktion	29
9.2. Isolierung der RuDP-Carboxy- lase aus Spinat	30
9.3. Testansatz zur RuDP-Bestim- mung	31
10. Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in Roh- extrakten aus <i>Chlorella vulg.</i>	31

	Seite
10.1. Herstellung des Rohextraktes	31
10.2. Ausführung des Tests	32
11. Chemikalien	34
III. Ergebnisse und Diskussion	35
Teil A: Charakterisierung des Pa-Abfalls beim Einschalten von Licht und Einordnung in das Photosynthese- schema	35
1. Untersuchungen unter N_2 ohne Zusatz von CO_2	36
1.1. Einfluß verschiedener Lichtin- tensitäten	36
1.1.1. Lichtintensitätsabhängig- keit des anaeroben Pa-Abfalls	36
1.1.2. Lichtintensitätsabhängig- keit der Photosynthese	39
1.1.3. Lichtintensitätsabhängig- keit der anaeroben Glucoseassimi- lation	39
1.1.4. Diskussion und Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Autoren	43
1.2. Untersuchung des Pa-Abfalls mit unterschiedlichen Lichtqualitäten	46
1.2.1. Die Photosynthese bei 665 nm und 715 nm	49
1.2.2. Der anaerobe Pa-Abfall bei 665 nm und 715 nm	49
1.3. Der anaerobe Pa-Abfall in Photo- synthese-Mutanten	50
1.4. Einfluß von DCMU auf den anaero- ben Pa-Abfall	53
2. Der Pa-Abfall unter N_2 mit Zusatz von CO_2	57
3. Untersuchungen des Pa-Abfalls unter aeroben Bedingungen	59
3.1. Direkter Vergleich des Pa-Abfalls unter N_2 und Luft	60
3.2. Lichtintensitätsabhängigkeit des aeroben Pa-Abfalls	62
3.3. Der aerobe Pa-Abfall bei 715 nm	62
3.4. Der aerobe Pa-Abfall in Gegenwart von 5×10^{-6} M DCMU	64

	Seite
3.5. Der aerobe Pa-Abfall im Dunkel-Licht-Wechsel nach Glucosefütterung	64
3.6. Diskussion der Ergebnisse	66
Teil B: Einwirkung von FCCP und Salicylaldoxim auf den Pa-Abfall und die Photosynthese	70
1. Der Einfluß von FCCP auf den anaeroben Pa-Abfall und die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung	73
2. Die Wirkung von Salicylaldoxim auf den anaeroben Pa-Abfall und die Photosynthese	78
3. Der Einfluß von FCCP auf die Photosyntheseinduktion unter aeroben Bedingungen	82
3.1. Der aerobe Pa-Abfall in Gegenwart von FCCP	82
3.2. Vergleich der Photosyntheseinduktion unter N_2 und Luft in Gegenwart von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP	83
3.3. Einwirkung steigender FCCP-Konzentrationen auf die steady-state-Photosynthese	86
3.4. Zeitabhängigkeit der FCCP-bedingten Photosynthesehemmung	87
4. Untersuchungen zur Inaktivierung von FCCP durch Licht	89
5. Diskussion und Vergleich eigener Befunde mit Ergebnissen anderer Autoren	93
Teil C: Messung des RuDP-Spiegels im Dunkel-Licht-Wechsel als Indikator der Auffüllung phosphorylierter Zwischenstoff-Pools und Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Photosynthese-Lag und Energieversorgung der Zelle	96
1. Auswirkung der FCCP-Hemmung auf den RuDP-Spiegel in ganzen Chlorellen	98

	Seite
2. Untersuchungen zur Regulation der RuDP-Bildung in lebenden Zellen	100
3. Diskussion der Regulationsversuche und Vergleich eigener Ergebnisse mit denen anderer Autoren	104
4. Untersuchungen zur Induktionsphase der Glucoseassimilation	106
4.1. Induktion der Glucoseassimilation unter FCCP beim Dunkel-Licht-Wechsel	108
4.2. Vergleichende Untersuchung der Induktionsphase von Glucoseassimilation und Photosynthese	108
4.3. Die Wirkung von O_2 -Zusatz während der Glucoseassimilations-Lag-Phase	111
4.4. Beteiligung von Sauerstoff an der anaeroben Glucoseassimilation	113
5. Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von FCCP auf Atmung, Gärung, Glucoseassimilation und Pa-Niveau der Zelle im Dunkeln	114
5.1. Die Energieversorgung während der aeroben Dunkelperiode	115
5.2. Diskussion der Ergebnisse	117
5.3. Energieversorgung während der anaeroben Dunkelperiode	118
5.4. Diskussion der Ergebnisse	120
Teil D: Hemmung der Photosyntheseinduktion durch Adenylate	124
1. Hemmbarkeit der in vitro $^{14}CO_2$ -Fixierung in Chlorella durch AMP	124
2. Einfluß weiterer Mononucleotide auf die in vitro CO_2 -Fixierung	127
3. Der Einfluß von ADP auf die in vitro CO_2 -Fixierung	128
4. Die Wirkung von Pa und PPa auf die in vitro CO_2 -Fixierung	131

	Seite
5. Einfluß verschiedener Glykolyse - Zwischenstoffe auf die in vitro CO ₂ - Fixierung	133
6. Untersuchungen über die Aktivierbar- keit des in vitro-CO ₂ -Fixierungs- systems im Chlorella-Rohextrakt	134
7. Diskussion der Ergebnisse	136
IV. Schlußbetrachtung	137
1. Die Beteiligung der cyclischen Photo- phosphorylierung an der Photosyn- these-Induktion	137
2. Die Beteiligung der cyclischen Photo- phosphorylierung an der steady-state- Photosynthese	140
V. Zusammenfassung	142
VI. Literaturverzeichnis	149

Verwendete Abkürzungen:

Chl.	Chlorophyll
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
PPO	2,5-Diphenyloxazol
TCS	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DCPIP	2,6-Dichlorphenylindophenol
Fd	Ferredoxin
fd	Ferredoxin-NADP-Reduktase
FMN	Flavinmononucleotid
NADP	Nicotinamidadenin-dinucleotidphosphat
PMS	N-methylphenazonium-Ion
	Phenazin-methosulfat
PC	Plastocyanin
PQ	Plastoquinon
Q	Primärer Elektronenakzeptor von System II
Y,Z	Hypothetische Elektronenakzeptoren
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
F6P	Fructose-6'-phosphat
FDP	Fructose-1,6'-diphosphat
G6P	Glucose-6'-phosphat
PGS	3'-Phosphoglycerinsäure
R-5-P	Ribose-5'-phosphat
Ru-5-P	Ribulose-5'-phosphat
RuDP	Ribulose-1,5'-diphosphat

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
cAMP	Adenosin-3',5'-cyclisches-monophosphat
3'-AMP	Adenosin-3'-monophosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
IMP	Inosin-5'-monophosphat

I. Einleitung:

Die Photosynthese bei Algen und höheren Pflanzen kann grundsätzlich in zwei Phasen getrennt werden. In der primären, photochemischen wird durch Anregung der in den Chloroplasten befindlichen Pigmente bei gleichzeitiger Sauerstoffentwicklung Strahlungsenergie in chemische Energie umgewandelt, mit deren Hilfe in einer anschließenden, chemischen Dunkelphase CO_2 auf die Stufe der Kohlenhydrate reduziert werden kann.

Als Bindeglied beider Teilreaktionen forderte bereits Ruben (1943) im Gegensatz zu Emerson (1944) auf Grund thermodynamischer und biochemischer Überlegungen PNH_2 und energiereiches Phosphat zur endergonischen Dunkelreaktion der CO_2 -Fixierung. Erste Hinweise für die Beteiligung von Phosphat ergaben sich aus einer lichtstimulierten P^{32} -Aufnahme an Chlorella und Scenedesmus (Gest u. Kamen 1948) sowie durch den im Licht erhöhten P^{32} -Einbau in die TCS-lösliche organische Phosphatfraktion bei Chlorella (Wassink et al. 1951) und Elodea (Simonis et al. 1952; Grube 1953). Unter Ausschaltung der Phosphat-Ionenaufnahme zeigte erstmals Kandler (1950) eindeutig eine erhebliche Abnahme des anorganischen Phosphat-Gehalts beim Dunkel-Licht-Wechsel in ganzen Chlorella-Zellen und bewies damit die Teilnahme von PO_4^{3-} an der Photosynthese. Ergänzende Hinweise lieferten Untersuchungen über den im Licht gesteigerten P^{32} -Einbau in ATP (Simonis u. Schwinck 1953) und über die rasche Zunahme der ATP-Konzentration im Dunkel-Licht-Wechsel unter anaeroben Bedingungen (Strehler 1952, 1953). Die schnelle P^{32} -Markierung von β -Phosphoglyzerinsäure als erstem Photosyntheseprodukt wurde ebenfalls als Beweis für die enge Verbindung von PO_4^{3-} und Photosynthese gewertet (Benson et al. 1950; Gaffron et al. 1951; Goodman et al. 1953).

Bereits Kandler (1954) konnte zeigen, daß die unter anaeroben Bedingungen nur geringfügige Glucoseaufnahme durch Licht erheblich gesteigert wurde, wobei durch Parallelexperimente eine Beteiligung photosynthetisch gebildeten Sauerstoffs ausgeschlossen werden konnte. In Verbindung mit Ergebnissen über den aeroben und anaeroben Phosphatabfall im Dunkel-Licht-Wechsel war er deshalb in der Lage, eine unmittelbar an die Lichtreaktion gekoppelte Phosphorylierung zu fordern.

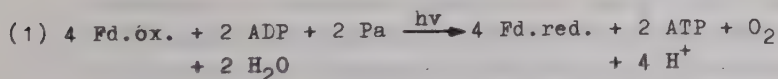
Bei Experimenten mit ganzen Zellen kann die Photosynthese jedoch nicht mit Sicherheit von anderen, ebenfalls am Phosphatmetabolismus beteiligten Reaktionen getrennt werden. Es wurden deshalb bereits frühzeitig Untersuchungen an zellfreien Systemen durchgeführt (Aronoff et al. 1948; Fager 1952 u. 1954). Nach Zusatz von ADP und anorganischem Phosphat zu ganzen, durch Differentialzentrifugation mitochondrienfrei erhaltenen Chloroplasten erfolgte im Licht bei Gegenwart von Ascorbat die Synthese von ATP (Arnon et al. 1954). Die Ausführung dieser Experimente unter Stickstoff-Atmosphäre in Anwesenheit von Chromchlorid zur Entfernung des eventuell entstehenden O_2 erbrachte keine Änderung der ATP-Bildungsrate und lieferte somit den Beweis für die Existenz einer anaeroben Synthese von Pyrophosphatbindungen (Arnon et al. 1955; Whatley et al. 1955). Durch osmotischen Schock aufgebrochene Chloroplasten zeigten identische Ergebnisse (Arnon et al. 1955; Whatley et al. 1956). Im Unterschied zur Atmungskettenphosphorylierung wurde die ATP-Bildung durch Chloroplasten als "Photosynthetische Phosphorylierung" bezeichnet. Neben Ascorbat erwiesen sich FMN (Whatley et al. 1955), Vitamin K_5 und Menadion (Arnon et al. 1955) als geeignete, natürlich vorkommende Cofaktoren. (Übersicht der Hill- und Redoxsubstanzen bei Kandler 1960. Tafel I) Insbesondere mit dem künstlichen Cofaktor PMS wurden bis zu fünffach höhere ATP-Raten ge-

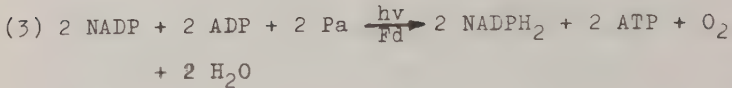
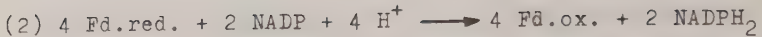
messen (Jagendorf et al. 1958). Aus diesem Befund ist jedoch zu erkennen, daß die gute Anwendbarkeit in einem "vitro"-System keine sicheren Rückschlüsse auf die Beteiligung des Cofaktors im natürlichen System zuläßt. Inzwischen wird das aus verschiedenen Organismen isolierte Eisenprotein Ferredoxin (Mortenson et al. 1962; Davenport et al. 1952; Arnon et al. 1957; San Pietro et al. 1958; Losada et al. 1961; Gewitz et al. 1962) als natürlicher Cofaktor der lichtgetriebenen Phosphorylierungsprozesse angesehen (Tagawa et al. 1963).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß belichtete Chloroplasten NAD oder NADP zu reduzieren vermögen (Vishniac u. Obhoa 1951; Tolmach 1951; Arnon et al. 1951; San Pietro u. Lang 1956). Die Zugabe von Chloroplastenextrakten zu aufgebrochenen Chloroplasten (Arnon et al. 1958; Jagendorf 1958) bewirkte eine stöchiometrische Koppelung von O₂-Produktion, ATP-Bildung und NADP-Reduktion. Dieser Befund machte eine Neubenennung der Phosphorylierungen notwendig.

1. Die nichtcyclische Photophosphorylierung in vitro

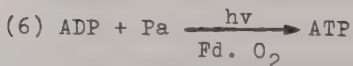
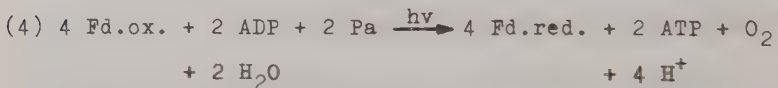
Arnon et al. (1967) konnten zeigen, daß Chloroplasten im Licht zugesetztes Ferredoxin quantitativ unter O₂-Entwicklung reduzieren. Die Stöchiometrie zwischen Fd. red. und O₂ betrug 4 : 1. Der Zusatz von NADP bewirkte in Anwesenheit von nur katalytischen Mengen Fd. eine Reoxidation des Fd. mit gleichzeitiger Reduktion des NADP. Da die gleichzeitige Messung der ATP-Produktion einen P/2e-Wert von 1 erbrachte, ergibt sich folgende Bilanz (Gleichung 3):





2. Die sauerstoffabhängige, nichtcyclische Photophosphorylierung in vitro

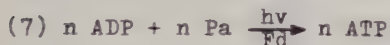
Niederer Sauerstoffpartialdruck führt bei Abwesenheit von NADP zu einer Rückoxidation des Fd.red. mit molekularem O_2 . Dieser Reaktionsverlauf ist dem cyclischen in der Bilanz gleich, da nur ATP gebildet wird, unterscheidet sich von ihm jedoch durch den permanenten O_2 -Umsatz. (Gleichung 6):



Ferredoxin weist jedoch eine größere Affinität zur Fd-NADP-Reductase auf als zu molekularem Sauerstoff. Deshalb kann O_2 nur bei völliger Abwesenheit von NADP oxidierend wirken. Bei der photosynthetischen CO_2 -Fixierung, die einen raschen Wechsel von NADPH_2 zu NADP verursacht, sollte demnach ein solches System kaum als wesentliche ATP-Quelle dienen können.

3. Die cyclische Photophosphorylierung in vitro

Der Beweis für die Existenz einer anaeroben cyclischen Lichtphosphorylierung in Abhängigkeit katalytischer Mengen Ferredoxin wurde unter Ausschaltung der nicht-cyclischen Phosphorylierung durch DCMU erbracht (Tagawa et al. 1963). Die Reaktion verläuft ohne jeden weiteren Netto-Umsatz gemäß Gleichung 7.



Die Vereinigung der Untersuchungsbefunde über die im Licht ablaufenden Phosphorylierungen mit den Ergebnissen über die durch eine Elektronentransportkette verbundenen zwei Photosysteme (Emerson et al. 1957; Duxens 1963; Kok et al. 1960 u. 1961) ließ nachfolgendes Photosynthese-Schema entstehen (Abb.: 1).

Die Anzahl der ATP-Bildungsstellen sowie ihre genaue Lage im Schema sind nicht mit Sicherheit anzugeben, da das Problem des nichtphosphorylierenden, basalen Elektronentransportes in vitro nicht befriedigend gelöst ist. Durch die Verwendung von Entkopplern wurden unterschiedliche ATP-Bildungsstellen für die cyclische und die nichtcyclische Phosphorylierung wahrscheinlich gemacht (Avron et al. 1963 u. 1965; de Kiewiet et al. 1965; Kandler et al. 1966). Neuere Arbeiten diskutieren eine völlige, auch das Pigmentsystem betreffende Abtrennung der cyclischen Photophosphorylierung als selbständige Einheit der ATP-Bildung von der auch für die NADP-Reduktion verantwortlichen nichtcyclischen Photophosphorylierung (Knaff u. Arnon 1969; Rurainsky, Randles u. Hoch 1971).

Entsprechend dem gegenwärtigen Photosyntheschema ergibt sich für die nichtcyclische Photophosphorylierung

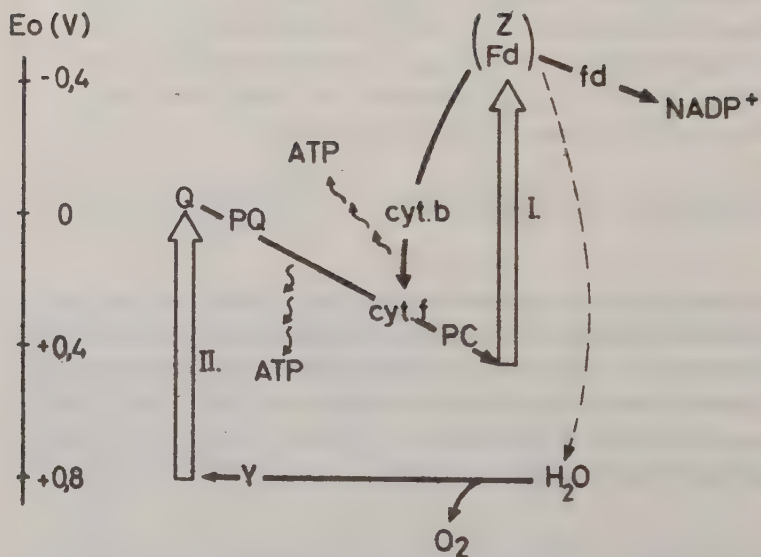


Abb.: 1 Photosyntheseschema nach Avron und Neumann (1968), abgeändert.

folgender Ablauf. Durch ein Pigmentsystem II, das Chlorophyll a_{II-690} (Döring et al. 1967) enthält, wird ein Elektron mittels Absorption eines Lichtquants von einem bisher nicht bekannten Stoff Y ($E_0 = 0,81$ V) auf den gleichfalls noch unbekannten Stoff Q ($E_0 = 0,0$ V) übertragen. Die nun oxidierte Komponente Y bewirkt

eine Wasserspaltung, die über die Bildung eines OH-Radikals und H^+ zur Freisetzung von O_2 führt. Das Pigmentsystem I oxidiert über eine Elektronentransportkette den Redoxkörper Q und reduziert gleichfalls unter Aufnahme eines Lichtquanten die Komponente Z ($E_0 -0,44V$). Bei dieser Reaktion ist das von Kok mit P_{700} bezeichnete Pigment wirksam, das mit dem Chlorophyll $a_{I-703-430}$ von Witt identisch zu sein scheint. In einer anschließenden Dunkelreaktion wird mittels Ferredoxin und der Ferredoxin-NADP-Reduktase NADP reduziert. Der Durchlauf der Elektronen durch die Transportkette wird zur ATP-Bildung genutzt.

Bei der cyclischen Photophosphorylierung werden unter Aufnahme von Lichtquanten durch Photosystem I Elektronen von P_{700} über den Akzeptor Z auf Ferredoxin übertragen. Über Redoxsysteme wie PMS oder Cyt. b_6 kehren diese Elektronen in die Transportkette zwischen beiden Lichtreaktionen zurück. Die genaue Stelle der Einschleußung kann noch nicht angegeben werden. Der Kreislauf der Elektronen wird durch ihre Rückkehr zum P_{700} geschlossen. Zwischen Fd. und P_{700} wird eine für den cyclischen Elektronentransport spezifische ATP-Bildungsstelle angenommen.

Die an in-vitro-Systemen zweifellos gut belegten Lichtphosphorylierungen bedürfen jedoch für den Beweis ihrer tatsächlichen Existenz in vivo der experimentellen Überprüfung an ganzen Zellen oder Zellsystemen. Im folgenden sollen nun wesentliche Befunde, die hierzu beitragen, kurz zusammengestellt und mit den in vitro Daten verglichen werden.

Forti und Parisi (1963) gelang es, an Spinat- und Saxifraga-Blättern im Dunkel-Licht-Wechsel unter N_2 -Begasung, also unter Bedingungen, die in Chloroplasten

zu einer cyclischen Photophosphorylierung geführt hatten, eine rasche Zunahme des ATP-Pools festzustellen. Bereits 1950 hatte Kandler unter denselben Bedingungen eine schnelle Abnahme des anorganischen Phosphatgehaltes in *Chlorella* erhalten, ohne jedoch diesen Vorgang "cyclische Phosphorylierung" zu nennen, da eine Unterteilung der Phosphorylierungen noch nicht üblich und notwendig war. Meßverfahren, die das unter den vorliegenden Bedingungen gebildete ATP zu gut faßbaren Stoffwechselreaktionen weiterverwendeten, erbrachten die Bestätigung der Existenz einer der in Chloroplasten ähnlichen cyclischen Photophosphorylierung. Als Maß dienten folgende Prozesse: der P^{32} -Einbau in die organische Phosphatfraktion (Gimmler et al. 1967; Urbach et al. 1970) und in die Polyphosphatfraktion (van Rensen 1969); die Aufnahme von Acetat (Wiessner 1965) und Glucose (Tanner et al. 1965, 1967, 1968 u. 1969; Kandler et al. 1966; Wiessner 1966); die Photoreduktion (Bishop et al. 1962; Bishop 1967) sowie die Synthese von Polysacchariden (Glagoleva et al. 1970) und der Isocitrat-Lyase (Syrett 1966). Die anaerobe, lichtabhängige Ionen-Aufnahme erwies sich ebenfalls als geeignetes Testsystem (Jeschke 1967 u. 1969; Marre et al. 1963; MacRobbie 1965 u. 1966). Für die cyclische Photophosphorylierung in vivo wurden verschiedene Charakteristika erarbeitet, die in den Chloroplastenversuchen ihre Parallelen finden und somit zur Sicherung der Existenz beitragen.

In Chloroplasten erfolgt bei Verwendung des Elektronen-Donorsystems Ascorbat-DCPIP bei gleichzeitiger Blockierung der II. Lichtreaktion mit DCMU eine Erhöhung der ATP-Bildungsrate sowie eine Zunahme der NADP-Reduktion, wenn Wellenlängen > 700 eingestrahlt werden (Hoch et al. 1963; Sauer et al. 1965). Arnon (1967) bestätigte diese Zunahme für das Pd -katalysierte, cyclische System. Die nichtcyclische Photophos-

phorylierung weist dagegen beim Übergang vom kurz- zum langwelligen Rotbereich eine erhebliche Zunahme des Quantenbedarfs auf (Arnon 1967; Schwartz 1967). Daraus ist ersichtlich, daß in Wellenlängenbereichen, in denen die Photosynthese mit schlechter Ausnutzung der Lichtenergie abläuft, die cyclische Photophosphorylierung ihre größte Wirksamkeit erhält. Von den der cyclischen Phosphorylierung in vivo zugeschriebenen Prozessen wurde die Acetataufnahme (Wiessner 1965), die Photoreduktion (Bishop 1967) und die Glucoseassimilation (Tanner et al. 1966 u. 1968; Wiessner 1966) im langwelligen Rotbereich untersucht. Übereinstimmend wurde eine Zunahme der Quantenausbeute bei Wellenlängen $\lambda > 680$ nm beobachtet und damit die in vivo Existenz bestätigt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Fd-katalysierte NADP-Reduktion und die damit verbundene nichtcyclische ATP-Bildung durch die niederen Konzentrationen von 3×10^{-7} M DCMU völlig unterbunden wurde (Arnon 1967). Unter denselben Bedingungen erfährt jedoch die cyclische Photophosphorylierung eine beträchtliche Stimulierung (Arnon 1967). Bei Verwendung von PMS, Vitamin K₅ oder FMN als Cofaktor ist ebenfalls keine Hemmung nachweisbar (Übersicht bei Losada 1963). Bereits Forti und Parisi (1963) konnten zeigen, daß trotz der Anwesenheit von DCMU-Konzentrationen, die eine Photosynthese an Spinat-Blättern völlig unterbinden, der ATP-Gehalt der Blätter bei Belichtung ansteigt. Dieser Beleg für die Existenz der cyclischen Photophosphorylierung in vivo wurde von weiteren Indikatorreaktionen mit übereinstimmenden Ergebnissen dokumentiert (Tanner et al. 1965 u. 1966; Kylin et al. 1967; van Rensen 1969; Urbach et al. 1970).

Eine zusätzliche Möglichkeit für den Beweis der cyclischen Photophosphorylierung ergibt sich aus der Ver-

wendung der Mutante Nr. 11 des Stammes *Scenedesmus D₃* (Bishop 1962), die durch Blockierung der II. Lichtreaktion keine Möglichkeit zur Photosynthese mehr besitzt (Bishop 1963). Die ungehinderte Durchführung der Photo-reduktion und der anaeroben, lichtabhängigen Glucose-assimilation (Tanner et al. 1967 u. 1969) durch die Mutante sprechen für die Existenz der cyclischen Photophosphorylierung *in vivo*.

Erhebliche Widersprüche ergeben sich hinsichtlich der sättigenden Lichtintensitäten. In Gegenwart der Cofaktoren PMS und Pyocyanin werden unphysiologisch hohe Lichtsättigungswerte von 200000 Lux gemessen (Avron 1960): Der durch Verwendung von Fd erreichte Sättigungswert von 25000 Lux steht auch noch im Gegensatz zu den zwischen 1000 und 2000 Lux liegenden Werten, die mit den *in-vivo*-Meßverfahren erzielt wurden (Tanner et al. 1965; Jeschke u. Simonis 1969; van Rensen 1969; Urbach et al. 1970). Eine Klärung dieses Unterschiedes konnte bisher nicht gefunden werden.

Die Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der photosynthetischen CO₂-Fixierung *in vivo* steht seit einigen Jahren im Blickfeld der Untersuchungen. Folgt man dem von Calvin und Mitarbeitern entworfenen Schema, so sind beim Einbau von CO₂ 3 Moleküle ATP sowie 2 Moleküle NADPH₂ erforderlich, um die Kohlen-säure auf die Stufe der Kohlenhydrate zu reduzieren. Entsprechend den *in vitro* Befunden von Arnon (1967) werden 2 ATP und 2 NADPH₂ von der nichtcyclischen Photophosphorylierung bereitgestellt, während das restliche ATP durch die im stöchiometrischen Verhältnis ablaufende cyclische Photophosphorylierung beige-steuert werden soll. Eine Blockierung der cyclischen Phosphorylierung *in vivo* sollte nach dieser Theorie zu einer raschen Hemmung der Photosynthese führen.

Versuche mit dem am Cyt. b der Atmungskette eingreifenden Antibiotikum Antimycin A zeigten jedoch, daß bei gleichzeitiger Hemmung der als Indikatorreaktionen für die cyclische Phosphorylierung geltenden Prozesse keine oder nur eine geringfügige Beeinträchtigung der Photosynthese zu beobachten war. (Tanner et al. 1966; Urbach et al. 1964) Die Verwendung von DSPD (Trebst et al. 1967; Gimmler et al. 1967), sowie von Entkopplern wie Salicylaldehyd (Tanner et al. 1969; Urbach 1969) und CCP (Tanner et al. 1969) und der die Energieübertragung hemmenden Stoffe Dio-9 und Phloridzin (Urbach et al. 1969) bestätigen diesen Befund. In diesen Ergebnissen muß deshalb ein Beweis dafür gesehen werden, daß die cyclische Photophosphorylierung nicht in stöchiometrischer Weise ATP zur CO_2 -Fixierung beisteuert. Es wurde angenommen, daß diese Lichtphosphorylierung ein System darstellt, das im Umfang der oxidativen Phosphorylierung entspricht und zum raschen Aufbau der für die Photosynthese notwendigen Pools an phosphorylierten Zwischenstoffen zu Beginn der Lichtperiode und zur Oligo- und Polysaccharidsynthese ATP beisteuern kann.

Die Existenz der nichtcyclischen Photophosphorylierung in vivo wird als gesichert erachtet (Avron et al. 1968). Ein Vergleich der in vitro Ergebnisse für ATP-Bildung und NADP-Reduktion mit der photosynthetischen CO_2 -Fixierung in ganzen Zellen zeigt weitgehende Übereinstimmung, z.B. in der Lichtsättigung, beim Verhalten gegenüber unterschiedlichen Lichtqualitäten und gegenüber Hemmstoffen. So konnte die in vitro Lichtsättigung bei 15 - 20000 Lux an Chlorella (Tanner et al. 1965) und an Ankistrodesmus (Urbach et al. 1970) bestätigt werden. Bei der Einstrahlung monochromatischen Lichts zeigte die Photoreduktion von NADP und die ATP-Bildung in Chloroplasten einen Quantenbedarf von 4 bei Wellenlängen zwischen 550 und 680 nm, jedoch

einen Wert von 14 Quanten bei 720 nm (Sauer et al. 1965; Schwartz 1967), wenn H_2O als Elektronendonator diente. Einen bedeutenden Quantenbedarfsanstieg in vivo beim Übergang von Hell- zu Dunkelrot fanden Emerson u. Lewis (1943) an *Chlorella* sowie Tanada (1951) an *Navicula*. Beide Prozesse, die nichtcyclische Photophosphorylierung in vitro und die in vivo Photosynthese zeigen durch ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber niedrigen DCMU-Konzentrationen wiederum übereinstimmendes Verhalten (Arnon et al. 1967; Tanner et al. 1966; van Kensen 1969; Urbach et al. 1970). Somit erscheint die Parallelität zwischen nichtcyclischer Photophosphorylierung in vitro und Photosynthese gesichert. Nicht bewiesen werden konnte bisher jedoch die in Analogie zur nichtcyclischen Photophosphorylierung in vitro angenommene nichtcyclische Photophosphorylierung in vivo und der Grad ihrer Beteiligung an der Photosynthese, obwohl beim Dunkel-Licht-Wechsel an Spinat, *Coleus* und Beta (Santarius et al. 1965), an Spinat und *Saxifraga* (Forti u. Parisi 1963) und an *Chlorella* (Strotmann 1969) ein rascher Anstieg des ATP-Pools zu verzeichnen war. Berechnet man die ATP-Bildungsrate aus der anfänglichen Kurvensteigung (Santarius et al. 1965), so erhält man Werte um 5 $\mu M/mg$ Chlorophyll/h, d.h., nur etwa 1% der nach dem Calvin-Schema für die CO_2 -Fixierung notwendigen ATP-Menge ist experimentell faßbar. Der unter $N_2 + CO_2$ und Luft + CO_2 als Maß der nichtcyclischen Photophosphorylierung verwendete P^{32} -Einbau in unizelluläre Algen (Gimmler et al. 1967) zeigt die gleiche Lichtintensitätsabhängigkeit wie die Photosynthese (Urbach et al. 1970), erreicht jedoch auch bei mehrstündig verarmten Algen nur PO_4^{3-} -Raten von 10 $\mu M/mg$ Chl./h, also nur etwa 2% der geforderten Menge (Ullrich et al. 1969). Dieselben Autoren stellten fest, daß der Zusatz von Salicylaldoxim, Phloridzin und

Dio-9 den P^{32} -Einbau erheblich erniedrigt, ohne jedoch die CO_2 -Fixierung wesentlich zu beeinflussen. Dies würde bedeuten, daß die Photosynthese ohne den durch Gifte hemmbaren Teil der nichtcyclischen Photophosphorylierung ablaufen kann, wenn die angewandte Meßmethode eine solche Phosphorylierung in vivo überhaupt erfaßt. An Elodea-Blättern wurde ein solcher Unterschied in der Hemmbarkeit nicht festgestellt (Gimmler et al. 1969). Die Erklärung, wonach vielleicht das in einzelligen Algen in größerem Umfang vorliegende Polyphosphat als Ersatz für ATP an der Photosynthese beteiligt sein könnte, kann für die gleichbleibende Photosynthese über mehrere Stunden hinweg nicht befriedigen. Ein Ersatz von ATP durch Pyrophosphat als Energiequelle für die Photosynthese wurde jedoch an Chloroplasten (Vose u. Spencer 1967) und an Bakterien (Pflüger 1971) wahrscheinlich gemacht. Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die Existenz der nichtcyclischen Photophosphorylierung und ihre Bereitstellung von ATP zur photosynthetischen CO_2 -Fixierung noch nicht endgültig gesichert ist.

Es erschien deshalb lohnend, erneut Versuche zur Messung der cyclischen und der nichtcyclischen Photophosphorylierung an lebenden Zellen durchzuführen. Die bereits von Kandler (1950) beschriebenen und zum Beweis für die Existenz einer Lichtphosphorylierung in vivo angeführten Schwankungen des endogenen Pa-Gehaltes im Dunkel-Licht-Wechsel wurden als hierzu geeignetes Testverfahren angesehen, das gegenüber bisherigen Meßmethoden einen wesentlichen Vorteil bieten sollte. Die oben angeführten Autoren verwendeten zur Messung der cyclischen ATP-Bildung in vivo anaerobe, lichtabhängige Prozesse wie ^{32}P - oder Cl^- -Aufnahme und Acetat - bzw. Glucoseassimilation vom Außenmedium ins Zellinnere. Alle diese Testreaktionen sind an die Funktion von Transportsystemen gebunden, über deren Energiebedarf bisher keine Angaben gemacht werden können. Die Be-

stimmung der Abnahmegeschwindigkeit von endogenem Pa nach einem Dunkel-Licht-Wechsel hingegen sollte hiervon unabhängig sein und zumindest unmittelbar nach Lichtgabe annähernd die tatsächlich ablaufende Phosphorylierungsgeschwindigkeit widerspiegeln.

Versuche zur direkten Messung der nichtcyclischen Photophosphorylierung in vivo wurden nur von Urbach und Gimmmler (1970) berichtet, wobei ebenfalls die ^{32}P -Einlagerung in die organische Phosphatfraktion als Maß dieser Lichtreaktion diente. In den Arbeiten anderer Autoren wird die cyclische Photophosphorylierung stets nur mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung oder der photosynthetischen O_2 -Entwicklung, nicht aber mit einer tatsächlich experimentell erfaßten nichtcyclischen Photophosphorylierung verglichen. Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit wurde deshalb darin gesehen, Pa-Spiegelschwankungen während der Photosynthese-Induktion in Abhängigkeit äußerer Parameter wie z.B. verschiedener Lichtintensitäten oder -qualitäten zu untersuchen. Es sollte damit überprüft werden, ob durch diese Meßmethode eine möglichst direkte und von Transportphänomenen unbeeinflusste Möglichkeit gegeben ist, die Existenz der in vivo nicht eindeutig dargelegten nichtcyclischen Phosphorylierung zu beweisen.

Eine stöchiometrische Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der photosynthetischen CO_2 -Fixierung wurde von Arnon (1967) nach in vitro Versuchen an Spinachchloroplasten gefordert. In vivo Untersuchungen verschiedener Autoren über diese Stöchiometrie konnten diese Forderung jedoch nicht bestätigen. Es wurde deshalb für den weiteren Verlauf der Arbeit beabsichtigt, erneut Experimente zu diesem Problem unter Mitwirkung der Entkopplers FCCP durchzuführen. Insbesondere wurde Wert darauf gelegt, den Einfluß dieses

Phenylhydrazon-Derivats an einem einzigen Organismus unter möglichst identischen Bedingungen auf verschiedene energieliefernde Prozesse vergleichend zu untersuchen und somit Einblick in die mögliche Notwendigkeit der Beteiligung dieser Systeme an der Photosynthese zu erhalten. Zusätzlich sollte herausgefunden werden, ob, und wenn, an welchen Stellen der CO_2 -Fixierungskette ein Mangel an cyclisch gebildetem ATP deutlich erkennbar wird.

Es wurde erhofft, in der Durchführung solcher Experimente einen Weg zu finden, die physiologische Rolle der cyclischen Photophosphorylierung in vivo näher charakterisieren zu können.

II. Material und Methodik:

1. Algenmaterial und Anzucht der Algen

Als Versuchsobjekt diente *Chlorella vulgaris*, 211-11 h und *Scenedesmus obliquus* der Göttinger Algensammlung sowie die Photosynthesemutanten *Scenedesmus* Nr. 11 und Nr. 8 von Bishop. *Chlorella vulg.* und *Scenedesmus obl.* wurden autotroph, die beiden Mutanten heterotroph und steril angezogen. Die Kultur erfolgte in zylindrischen Literflaschen von 8 cm Durchmesser bei 28°C im Dauerlicht von etwa 3000 Lux. Als Lichtquellen dienten 40 Watt Tageslichtleuchtstoffröhren. Die Flüssigkeitskulturen wurden mit Luft +2 Vol.-% CO₂ begast. Das Animpfen erfolgte, soweit es sich um insterile Ansätze handelte, mit Algenmaterial aus bereits vorhandenen Zuchtflaschen. Bei steriler Anzucht wurden Algen verwendet, die auf Nährsalzagar im Dauerlicht gewachsen waren.

Die Kulturmedien enthielten pro Liter Wasser in Gramm:

Chlorella vulgaris

Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,1; MgSO₄·7H₂O, 0,1; KH₂PO₄, 0,1;
KNO₃, 0,4; KCl, 0,03; FeCl₃, 0,0028;
sowie 5ml gesättigte EDTA-Lösung (freie Säure) und
1 ml Hoaglands A-Z-Lösung.

Scenedesmus obliquus

KNO₃, 0,81; NaCl, 0,47; NaH₂PO₄·2H₂O, 0,47; Na₂HPO₄·
12H₂O, 0,36; MgSO₄·7H₂O, 0,25; CaCl₂·6H₂O, 0,02;
FeSO₄·7H₂O, 0,01;
sowie 4 ml gesättigte EDTA-Lösung und 1 ml Hoaglands
A-Z-Lösung.

Scenedesmus Mutanten Nr. 11 und Nr. 8

Zusätzlich zu den bei Scenedesmus obliquus aufgeführten Bestandteilen wurden dem Medium 2 Gramm Glucose und 0,25 Gramm Hefeextrakt zugefügt.

2. Versuchsvorbereitung und Algendichte

Drei bis vier Tage alte Kulturen von Chlorella und Scenedesmus sowie 10 bis 12 Tage alte Kulturen der Mutanten wurden geerntet, in einer Becherzentrifuge 5 Min. bei 3500 Upm abzentrifugiert und einmal mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Sollten die Algen phosphatfrei erhalten werden, so wurden sie fünfmal mit insgesamt sechs Liter aqua dest. gewaschen. Im letzten Waschwasser konnte kein anorganisches Phosphat nachgewiesen werden. Die Algen wurden nun in frisch bereitetem, phosphatfreiem Nährmedium ($\text{pH} = 5,6$) aufgenommen und auf die gewünschte Dichte eingestellt. Als Maß der Dichte diente die Trübungsmessung bei 546 nm und 1 cm Schichtdicke, gemessen am Eppendorf Spektralphotometer. Die Enddichte bei allen Experimenten betrug im Versuchsansatz, wenn nicht anderweitig vermerkt, etwa O.D. = 0,3. Dieser Dichte entsprechen 28 μl packed cells/ml Algensuspension.

3. Messung des Phosphatabfalls und apparativer Aufbau

Sechzig ml phosphatfrei gewaschener Algen wurden in einen Erlenmeyerkolben gegeben, der mit Ausnahme der Bodenfläche schwarz gestrichen war (Kandler 1950). In die Algensuspension ragten von drei Seiten Glas-kanülen, durch die das jeweils verwendete Gas eingepreßt wurde. Auf diese Weise konnten die Algen in steter Turbulenz gehalten werden. Der Kolben befand

sich in einem mit Ausnahme einer kreisförmigen Bodenfläche (20 cm Ø) schwarz gestrichenen Glaswanne. Die Temperatur dieses Wasserbades betrug bei allen Versuchen 28°C. Die Beleuchtung erfolgte von unten durch die nicht gestrichene Fläche der Glaswanne mittels einer 300 Watt Compta-Lux Lampe der Firma Osram. Die Wärmestrahlung wurde zusätzlich zum Wasserbad von einem stets durchströmten 5 cm starken Wasserfilter absorbiert. Die Einstellung verschiedener Lichtintensitäten erfolgte durch Veränderung des Lampenabstandes und das Einlegen engmaschiger Metallgitter in das Wasserbad. Farblichtversuche wurden nach zusätzlichem Einlegen von Farbgläsern (RG 5 für 665 nm und RG 10 für 715 nm der Fa. Schott und Gen., Mainz) in das Wasserbad durchgeführt. Die Lichtmessung erfolgte in Höhe der Bodenfläche des Kolbens mit einem Luxmeter der Fa. Dr. B. Lange GmbH bei Verwendung von Weißlicht. Bei Farblichtversuchen wurde eine geeichte Thermosäule der Fa. Kipp u. Zonen mit angeschlossenem Voltmeter der Fa. Hewlett-Packard 419 A zur Intensitätsmessung herangezogen.

Die jeweils verwendeten Gase wurden vor ihrem Einleiten in den Versuchskolben durch zwei Waschflaschen mit destilliertem Wasser geleitet. Sollte CO₂-freie Luft eingeblasen werden, so wurde die Preßluft zusätzlich durch zwei Waschflaschen mit 10%-iger KOH gedrückt.

Während der 15 bis 20 Minuten dauernden Vorbegasung war der Apparat verdunkelt. Kurz vor Freigabe des Strahlenganges wurden mit einer Pipette Dunkelproben zu je 3 ml Suspension entnommen und mit je 1 ml 20%-iger Trichloressigsäure vereinigt. Die Konstanz der entnommenen Volumina wurde durch Wägung überprüft. Nach Belichtungsbeginn erfolgte die Probenentnahme mit den bei den Einzelversuchen angegebenen Zeitintervallen. Die in TCS abgetöteten Algen wurden

60 Minuten im Eisbad extrahiert und anschließend 10 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert. Aus dem klaren Überstand wurden aliquote Teile zur Phosphatbestimmung verwendet.

4. Methoden der Phosphatbestimmung

4.1. Optischer Test nach Robison und Martland

Zu der zu bestimmenden Lösung werden in einem 15 ml Meßkolben 1 ml 30%-ige H_2SO_4 , 1 ml 10%-ige Ammoniummolybdatlösung und 1 ml reduktionslösung (20 g wasserfreies Na_2SO_3 und 0,5 g Hydrochinon in aqua dest. unter Erwärmen lösen und nach Abkühlen ad 250 ml auffüllen) gegeben. Der Bestimmungsansatz wird mit aqua dest. auf 15 ml aufgefüllt, gut durchmischt und die Extinktion der sich bei Raumtemperatur entwickelnden Blaufärbung nach 30 Minuten bei Wellenlängen zwischen 680 nm und 700 nm gemessen.

4.2. Optischer Test nach King

Zu der in einem 15 ml Meßkolben befindlichen Probelösung werden 2 ml Molybdatschwefelsäure (5 g Ammoniumheptamolybdat + 95 ml 15%-ige H_2SO_4) und 0,5 ml Sulfonsäurereagens (500 mg 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure, 27,5 g $NaHSO_3$ und 6 g Na_2SO_3 in 250 ml aqua dest. lösen) gegeben. Die Messung erfolgt nach genau 5 Minuten Farbentwicklung bei der Wellenlänge 690 nm.

4.3. Optischer Test nach Chen, Toribara und Warner

In ein Reagenzglas werden 2 ml der zu untersuchenden Lösung ($P < 8 \mu\text{g}$) gebracht und mit aqua dest. auf 4 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 4 ml Testreagens wird gut durchmischt, das Glas mit Parafilm verschlossen und 75 Minuten bei 37°C erwärmt. Die entwickelte Farbe ist über mehrere Stunden konstant. Vor der Messung der Extinktion bei 820 nm wird die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt und das im Glas entstandene Kondenswasser mit der Farblösung vereinigt. Das Testreagens besteht aus:

2 Volumenteilen	aqua dest.
1 Volumenteil	6 n H_2SO_4
1 Volumenteil	Ammoniummolybdatlösung (2,5%-ige)
1 Volumenteil	Ascorbinsäurelösung (10%-ige)

4.4. Vergleich der Testverfahren

In Abb. 2 sind die Absorptionsspektren der beschriebenen Verfahren vergleichend aufgetragen. Der Kurvenverlauf nach Robison u. Martland und nach King erwies sich als identisch. Die nach dem Verfahren von Chen et al. erzielte Farbe weist bei 820 nm ein Maximum auf, das zur Messung verwendet wird. Abb. 3 vergleicht die Abhängigkeit der Extinktion von der eingesetzten Menge anorganischen Phosphors. Auch hierbei wird die Parallelität der Testverfahren nach King und Robison - Martland deutlich. Der Vorteil des Nachweises nach King liegt demnach in der schnellen Farbentwicklung. Die Anwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel durch

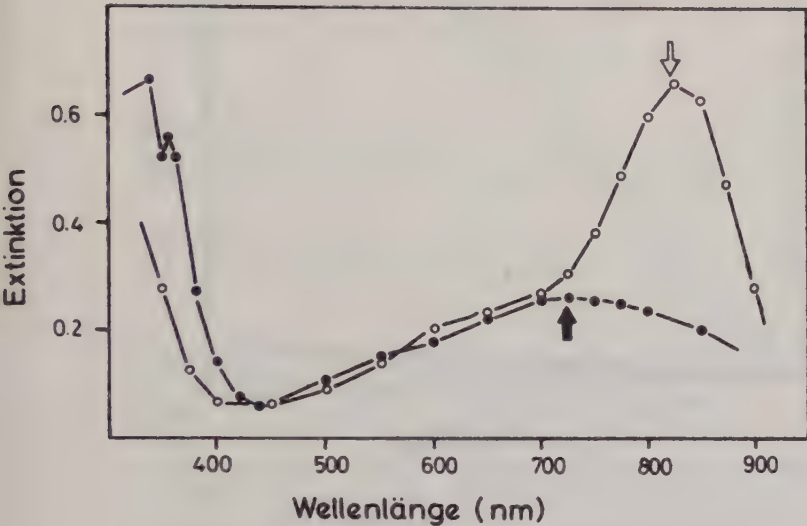


Abb. 2: Vergleichende Darstellung der Absorptionsspektren der verwendeten Testverfahren;
(o - o) Test nach Chen et al., 6 μg Pa/Probe
(● - ●) Test nach Robison - Martland, 40 μg Pa/Probe; Test nach King, 40 μg Pa/Probe

Chen et al. ergibt eine 15-fache Steigerung der Farbin-
tensität und ermöglicht die Verwendung kleiner Extrakt-
proben. Aus der Abbildung geht weiter hervor, daß weder
das Kulturmedium noch TCS eine Änderung der Farbin-
tensität hervorrufen. Weiterhin wurde geprüft, ob unter
diesen Temperaturbedingungen eine meßbare Hydrolyse des
im Extrakt befindlichen ATP den tatsächlichen Pa-Gehalt
verschleiert. Tabelle 1 zeigt das Ergebnis für die Me-

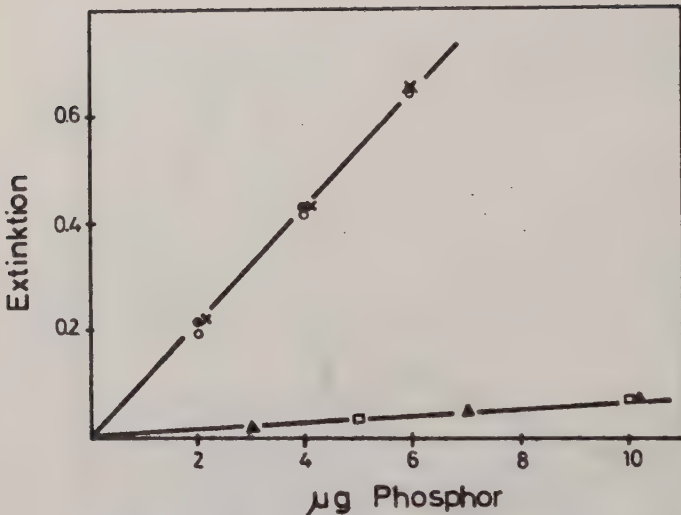


Abb. 3: Farbintensitätsvergleich der Testverfahren
(▲) Test nach Robison u. Martland
(□) Test nach King
(○) Test nach Chen, Toribara u. Warner
(×) Test nach Chen et al. mit Kulturmedien
(●) Test nach Chen et al. mit Kulturmedium und TCS

thoden nach Chen et al. und King. Nach beiden Verfahren werden nicht mehr als 15% der endständigen Phosphatgruppen des im Test vorhandenen ATP abgespalten. Nach Santarius und Heber (1965) beläuft sich der Pa-Gehalt in Spinat, Beta und Coleus auf etwa $4 \times 10^{-3} \text{ M}$. Eigene Untersuchungen an Chlorella ergaben einen Gehalt von $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ bis $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Pa. Die Konzentrationen für ATP liegen im Bereich von $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ bis $5 \times 10^{-4} \text{ M}$. Dies wurde von Santarius und Heber (1965) für Spinat, Beta

und Coleus, von Kandler u. Haberer-Liesenkötter (1963) für Chlorella gezeigt. Ein Fehler bei der Pa-Bestimmung durch Hydrolyse von ATP liegt demnach unter der Meßgenauigkeit der Testverfahren.

Tabelle 1:

Untersuchung der Pa-Tests auf ATP-Hydrolyse

Methode	Zusatz		Nachweis	% d. Zu-	% d. End-
	$\mu\text{M ATP}$	$\mu\text{M Pa}$	$\mu\text{M Pa}$	satzes	gruppen
King	2,66	8	0,29	3,6	10,8
Chen	0,33	1	0,045	4,5	13,5

5. Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung

Die Versuche zur Messung der Photosynthese wurden in derselben Apparatur durchgeführt, die eingangs für die Pa-Experimente beschrieben wurde. Dem Versuchsansatz von 60 ml Algen war $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ mit einer Endkonzentration von $7,56 \mu\text{g/ml}$ ($= 0,272 \mu\text{C/ml}$) zugesetzt. Zur Begasung wurde Stickstoff verwendet. Die Beleuchtungsbedingungen und der Zeitpunkt der Bicarbonat-Zugabe sind bei den jeweiligen Experimenten gesondert aufgeführt. Zu den gewünschten Zeiten wurden 0,3 ml der Suspension entnommen und mit 1 ml Äthanol-Eisessig (95 : 5) vereinigt. Je 0,5 ml des Extraktes wurden auf Aluminiumplättchen aufgetragen und unter der Infrarotlampe eingetrocknet. Die Bestimmung der Ak-

tivität erfolgte mit dem Methandurchflußzählrohr der Fa. Friesseke u. Hoepfner, Erlangen.

6. Messung des O₂-Gaswechsels

Der O₂-Gaswechsel der Zellsuspensionen wurde polarographisch (KCl-Elektrode, Oxygraph der Fa. Gilson) erfaßt und die Veränderungen wurden mittels eines Schreibers dargestellt. Die zum Versuch bestimmten, in Nährmedium befindlichen Algen wurden einem bei 26,5°C im Wasserbad durch kräftiges Schütteln belüfteten Vorratsgefäß entnommen und durch Zusatz von Hemmstoff und aqua dest. auf die Enddichte von O.D. = 0,3 gebracht. Um eine konstante Atmungsrate unter Gifteinwirkung zu erzielen, wurden die Algen erneut 10 Minuten im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden sie in die verdunkelte Meßküvette des auf 26,5°C vortemperierten Oxygraphen überführt, luftblasenfrei verschlossen und mittels eines Magnetrührers in Turbulenz gehalten. Die Versuche wurden durch Anlegen der Meßspannung gestartet. Zur Photosynthesemessung wurde dem Ansatz NaHCO₃ (Endkonzentration $2 \times 10^{-2} \text{ M}$) zugesetzt. Erfolgte die Messung der Photosyntheseinduktion unter aeroben Bedingungen, so wurde nach einigen Minuten der Dunkelatmung die Verdunkelung der Küvette entfernt und die Lichtquelle (300 Watt Compta-Lux Lampe der Fa. Osram) eingeschaltet. Sollte die Induktion unter Anaerobiose erfaßt werden, so wurde die Probe während der 10 Minuten im Wasserbadschüttler mit nachgereinigtem Stickstoff begast. Nach Überführung der Algen in die Küvette wurde die eventuell auftretende Restatmung bis zum völligen Verbrauch von O₂ verfolgt. Nach 5 Minuten in Anaerobiose wurde mit der Messung der Photosynthese begonnen.

7. Messung der Glucoseassimilation

7.1. Induktion des Aufnahmesystems

Da photoautotroph wachsende Chlorellen keine Glucose aus dem Medium aufzunehmen vermögen, muß das Glucoseaufnahmesystem vor versuchsbeginn induziert werden.

Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

126 ml	Algensuspension (O.D. = 0,4)
45 ml	Kulturmedium
4 ml	Glucoselösung ($1 \times 10^{-1} \text{M}$)

Der Gesamtansatz wurde bei 28°C im Wasserbadschüttler inkubiert. Um die völlige Aufnahme des Zuckers zu garantieren, wurden nach 2 Stunden beginnend, halbstündlich Proben zu 1 ml entnommen, abzentrifugiert und aliquote Teile des Überstandes zur Glucosebestimmung verwendet.

7.2. Versuchsdurchführung

59 ml des glucosefreien Inkubationsansatzes wurden in die oben beschriebene, mit N_2 vorbegaste Apparatur gebracht und im Dunkeln 15 Minuten adaptiert. Nach Zugabe von 1 ml $1 \times 10^{-1} \text{M}$ Glucoselösung wurde die Beleuchtung eingeschaltet und sofort eine Anfangsprobe zu 2 ml entnommen. Die Probe wurde abzentrifugiert und der Überstand bis zur Zuckerbestimmung in Eis aufbewahrt. Nach einer Versuchsdauer von 20 bzw. 25 Minuten fand wiederum eine Probenentnahme statt. Die von den Algen aufgenommene Glucosemenge ergab sich aus der Differenz der in den Anfangs- und Endproben bestimmten Glucosekonzentrationen.

7.3. Zuckerbestimmung nach Folin und Wu

Zu der zu untersuchenden Probelösung wurde 1 ml der Lösung A (40 g Na_2CO_3 ; 400 ml aqua dest.; 7,5 g Weinsäure; 4,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; ad 1000 ml) gegeben, die Probe 7 Minuten bei 100°C gekocht und anschließend 3 Minuten in Leitungswasser gekühlt. Hierauf erfolgte die Zugabe von 1 ml Lösung B (35 g Molybdänsäureanhydrid; 400 ml 5%-ige NaOH; 30 Minuten kochen; nach dem Abkühlen 125 ml 85%-ige H_3PO_4 ; ad 500 ml). Nach 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 10 ml aqua dest.. Die Probe wurde gut gemischt und die entstehende Blaufärbung nach weiteren 40 Minuten im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 650 nm gegen die Leerprobe gemessen. Die Auswertung erfolgte an Hand einer Eichkurve.

7.4. Aufnahme von Glucose-(U)- ^{14}C

Induzierte Algen wurden in ein 100 ml-Kölbchen gebracht, verdunkelt und 15 Minuten vorbestraht. Die Zugabe der Gifte erfolgte 6 Minuten, der Zusatz von Glucose unmittelbar vor Versuchsbeginn. Die Kontrollansätze enthielten die der Giftmenge entsprechende Menge des Lösungsmittels. Der Versuchsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

8,5 ml	Algensuspension (O.D. = 0,355)
0,7 ml	Hemmstoff bzw. Lösungsmittel
0,3 ml	Glucose-(U)- ^{14}C (1 $\mu\text{C}/\text{ml}$)
0,5 ml	Glucoselösung ($1 \times 10^{-1}\text{M}$)

Die Einstrahlung der jeweiligen Lichtintensität erfolgte unmittelbar nach Entnahme von 0,5 ml Algensuspension als Dunkelkontrolle. Weitere Probenentnahmen richteten sich nach den in den Graphiken angegebenen Zeitabständen. Die Probelösungen wurden auf eine mit dem Membranfilter (Porengröße $0,8 \mu$) der Fa. Sartorius versehene Nutsche der Fa. H. Hözel/Dorfen gebracht. Das radioaktive Versuchsmedium wurde abgesaugt und die auf dem Filter verbliebene Algenschicht zweimal mit je 4 ml eisgekühltem Kulturmedium nachgewaschen. Um die Stoffwechseltätigkeit der Algen zu stoppen, wurden die Filter anschließend 5 Minuten bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Bestimmung der Aktivität mit dem Methandurchflußzählrohr.

7.5. Messung der Glucoseassimilation im Warburg-Apparat

Bei allen Experimenten kamen kegelförmige Gefäße mit Mitteleinsatz und Seitenkipper zur Verwendung. Auf die einzelnen Räume waren verteilt:

Hauptraum: 3,40 ml Algen (O.D.=0,355)

0,28 ml Hemmstoff oder Lösungsmittel

Mitteleinsatz: 0,2 ml Pyrogallol-Lösung

(0,4 ml 25%-ige Pyrogallol-Lsg.
+ 2 ml conc. KOH)

Seitenkipper: 0,12 ml Glucose-(U)- ^{14}C ($1\mu\text{C}/\text{ml}$)

0,20 ml Glucoselösung ($1 \times 10^{-1} \text{M}$)

Die Gefäße wurden im Dunkeln 15 Minuten mit Stickstoff begast. Um den Einfluß von endogenen unter Lichteinfluß gebildetem O_2 auf die Glucoseassimilation zeigen zu können, wurde in den Parallelansätzen Pyro-

gallol nicht zugesetzt. Nach der Dunkelbegasung wurde die Glucose in den Hauptraum gekippt und die Beleuchtung eingeschaltet. Die Entnahme und Verarbeitung der Proben erfolgte wie unter 7.4. vermerkt.

8. Messung der Gärung

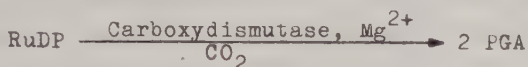
Mehrfach gewaschene Algen wurden mit 0,08 M Na-PO₄-Puffer, pH = 5,6, auf die Dichte 0,4 gebracht und mit Glucose zu folgendem Inkubationsansatz vereinigt:

18,00 ml Algensuspension
0,57 ml Glucoselösung ($1 \times 10^{-1} \text{M}$)
1,70 ml Glucose-(U)-¹⁴C (1 μ C/ml)

In einem nicht radioaktiven Zweitansatz wurde gemäß 7.1. die Zuckeraufnahme verfolgt. Nach völligem Glucoseverbrauch wurden 2,4 ml Algen in kegelförmige Warburggefäße gebracht und durch Zugabe von Hemmstofflösung bzw. Lösungsmittel auf ein Endvolumen von 3 ml aufgefüllt. In den Mitteleinsätzen der Gefäße befanden sich verkürzte Fiolax-Gläser mit 0,2 ml reinem Äthanolamin sowie Filterpapierstreifen zur Absorption des bei der Gärung entstehenden ¹⁴CO₂. Die Versuchsdauer belief sich auf 3 Stunden bei 28°C unter N₂. Bei der Probenentnahme wurden die Gläschen aus den Einsätzen entfernt, auf der Außenseite von eventuell anhaftenden Algen gereinigt und in das Scintillationsgemisch (10 ml Toluol + 0,5% PPO, 2 ml Methanol) gebracht. Zur Messung der wasserlöslichen Gärungsprodukte wurden die Algensuspensionen mit Essigsäure versetzt und abzentrifugiert. Aliquote Teile des klaren Überstandes wurden in 5 ml Dioxan/PPO der Messung unterzogen. Zur Bestimmung der Radioaktivität diente ein Flüssigkeitsscintillationszähler Modell Beckmann LS 100.

9. Nachweis von Ribulose-1,5-diphosphat

Der Nachweis erfolgte nach der Methode von Latzko u. Gibbs (1970). Die Testreaktion verläuft quantitativ nach der Gleichung:



Das im Algenextrakt vorhandene RuDP wird durch das Enzym carboxydismutase unter Zusatz von $^{14}\text{CO}_2$ in Form von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in 2 Moleküle PGA übergeführt, von denen eines als $\text{PGA-}^{14}\text{C}$ vorliegt. Nach Entfernung des nicht umgesetzten CO_2 wird die Radioaktivität der Probe bestimmt. Sie ist proportional der Menge RuDP im Extrakt.

9.1. Versuchsdurchführung und Algenextraktion

Zur Versuchsdurchführung wurde der eingangs beschriebene Apparat verwendet. nach 15 Minuten Dunkelbegasung wurden 2 Proben zu je 3 ml entnommen und mit je 10 ml Extraktionsgemisch (Äthanol/Tris-HCl-Puffer, 1 M, pH = 7,0, Mischungsverhältnis 95:5) vereinigt. Die Extraktionszeit im kochenden Wasserbad betrug 3 Minuten. Nach raschem Abkühlen wurde der Extrakt durch Einblasen eines starken Luftstromes bis zur Trockne eingeengt. Nach Zugabe von 2 ml aqua dest. zur Lösung des Rückstandes wurden die Proben abzentrifugiert (10 Min. bei 4000 Upm) und aliquote Teile des Überstandes zum RuDP-Nachweis verwendet.

9.2. Isolierung der RuDP-Carboxylase aus Spinat

Spinat eines örtlichen Gärtnereibetriebes wurde entstielt, entrippt, mehrmals mit aqua dest. gewaschen und bei 3°C - 4°C im Kühlraum mit einem Mixer 3 Minuten in vorgekühltem 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH = 8,9, homogenisiert (Gewichtsverhältnis Spinat : Puffer = 1 : 5). Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Zellstoff gepreßt und der Rohextrakt im vorgekühlten Standzylinder aufgefangen. Die Endkonzentration der anschließenden mit festem Ammoniumsulfat durchgeführten Fällung betrug 30%. Der Extrakt wurde nun bei 3°C 20 Minuten mit 8000 Upm zentrifugiert und vom Niederschlag abdekantiert. Die Endkonzentration der zweiten Ammoniumsulfatfällung war auf 50% festgelegt. Die Zeit der Ammoniumsulfatzugabe betrug jeweils 45 Minuten. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm und 3°C wurde der Überstand abdekantiert, der grüne Niederschlag in 50 ml 0,1 M Hepes-Puffer, pH = 7,8, aufgenommen, in einem Stahlzentrifugenbecher 3 Minuten auf 60°C erhitzt, sofort im Eisbad abgekühlt und erneut 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der, das Enzym enthaltende, bernsteinfarbige Überstand wurde einer dritten Ammoniumsulfatfällung mit der Endkonzentration von 50% unterworfen. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 13000 Upm und 3°C wurde das im Niederschlag befindliche Enzym mit 0,1 M Hepes-Puffer, pH = 7,8, unter Zusatz von $1\ \mu\text{M}$ Dithiotreitol/ml Puffer gelöst, auf verschiedene Portionen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

9.3. Testansatz zur RuDP-Bestimmung

Im Gesamtvolumen von 1 ml waren enthalten:

Dithiotreitol	2,5	μM
Tris-HCl, pH = 8,3	50,0	μM
MgCl ₂	20,0	μM
Glutathion, red.	5,0	μM
NaH ¹⁴ CO ₃ (5 μC)	25,0	μM
Algenextrakt	0,2	ml

Der Test wurde durch Zugabe von 0,05 ml der isolierten Carboxylase gestartet und nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 28°C durch Zutropfen von Ameisensäure gestoppt. Nach Zentrifugation der Testgläschen bei 4000 U₉₀ wurden aliquote Teile des Überstandes in Scintillationsgläser pipettiert und der Infrarat-Trocknung zur Entfernung des überschüssigen ¹⁴CO₂ unterworfen. Vor der Zugabe des Scintillationsgemisches (Dioxan/PPO) wurde den Proben 0,2 ml aqua dest. zugesetzt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im Flüssigkeitsscintillationszähler der Fa. Beckmann Modell LS 100.

10. Messung der ¹⁴CO₂-Fixierung in Rohextrakten aus Chlorella vulg.

10.1. Herstellung des Rohextraktes

Die Messung der CO₂-Fixierung durch Rohextrakte von Chlorella wurde in Anlehnung an die für Bakterien von Rindt und Ohmann (1969) sowie für Spinat von Johnson et al. (1965) erarbeitete Methode durchgeführt. Algen aus mehreren Kulturflaschen wurden geerntet, zentrifugiert und mit aqua dest. mehrmals gewaschen. Die Algen wurden in etwa 12 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer,

pH = 7,5 ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol) aufgenommen und mit Hilfe einer X-Preß der Fa. Wacka (Schweden) Modell X-25 aufgeschlossen. Das Homogenat wurde anschließend bei 3°C mit 13000 Upm 45 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde der Proteinbestimmung nach Lowry (1951) unterzogen, mit dem zur Extraktion verwendeten Puffer auf die gewünschte Konzentration von 3 mg Protein/ml Extrakt gebracht, in mehrere Portionen aufgeteilt und bis zur Verwendung eingefroren. Der Niederschlag wurde verworfen.

10.2. Ausführung des Tests

Im Endvolumen von 1 ml des Testansatzes waren enthalten:

Tris-HCl-Puffer, pH = 7,5	30 μM
MgCl_2	15 μM
ATP	3 μM
R-5-P, Ru-5-P, oder RuDP	3 μM
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (1,25 μC)	5 μM

Als Ba-Salz geliefertes Ru-5-P und RuDP wurden mit dem Ionenaustauscher Dowex in die H-Form übergeführt. Nucleotidzusätze wurden, soweit nötig, vor ihrer Anwendung neutralisiert. Der Test wurde durch Zugabe von 0,5 ml Rohextrakt (= 1,5 mg Protein) gestartet, 6 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 Tropfen conc. Ameisensäure zum Ausfällen des Proteins und zur Entfernung des nicht verbrauchten CO_2 gestoppt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4000 Upm wurden 0,5 ml des Überstandes auf Aluminiumplättchen aufgetragen und unter der Infrarotlampe eingetrocknet. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit dem Methandurchflußzählrohr.

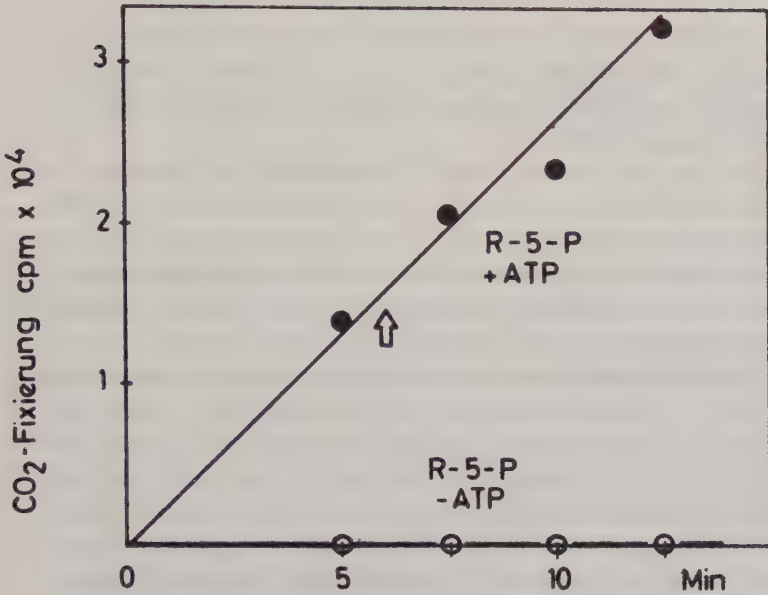


Abb. 4: Kinetik der in vitro CO₂-Fixierung mit R-5-P als Substrat

(● - ●) mit ATP im Ansatz

(○ - ○) ohne ATP im Ansatz

(↑) Ende der Inkubationszeit bei Reihenversuchen

Abbildung 4 zeigt eine Kinetik der in vitro CO₂-Fixierung. Ohne Zusatz von ATP findet keine Fixierung statt. Die für die Reihenversuche ausgewählte Reaktionszeit liegt im linearen Teil der Kinetik.

11. Chemikalien

Radioaktive Substanzen wie $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ und Glucose-(U)- ^{14}C wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, bezogen. Ru-5-P sowie RuDP wurden von der Fa. Sigma Chemical Company geliefert.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Nucleotide sowie R-5-P konnten bei der Fa. Boehringer, Mannheim, GmbH, erworben werden.

Die übrigen für Algenanzucht und Testverfahren verwendeten Chemikalien waren bei der Fa. Merck, Darmstadt, erhältlich.

Alle Chemikalien waren von höchster erhaltbarer Reinheit.

III. Ergebnisse und Diskussion

Teil A: Charakterisierung des Pa-Abfalls beim Einschalten von Licht und Einordnung in das Photosyntheseschema

Frühere Untersuchungen an verdunkelten und belichteten Chlorellen erbrachten nur geringfügige Unterschiede des anorganischen Phosphatspiegels (Emerson et al. 1944). Da sich diese Versuche auf den stationären Zustand in den Algen bezogen, konnten keine Aussagen über die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsgeschwindigkeit gemacht werden. Der gemessene Pa-Wert stellte jeweils nur das Ergebnis eines Fließgleichgewichts dar, wobei die Phosphorylierungsgeschwindigkeit den gleichen Wert wie die Dephosphorylierungsgeschwindigkeit aufweist. Gut meßbare Änderungen im Phosphatgehalt der Zellen, die Aussagen über die Reaktionsgeschwindigkeit erlauben, sind nur erhältlich, wenn Geschwindigkeitsänderungen der beiden entgegengesetzten Reaktionen nicht synchron erfolgen, also nur von einer erneuten Gleichgewichtseinteilung. Bereits 1950 konnte Kandler eine schnelle Abnahme des anorganischen Phosphates in den ersten beiden Minuten nach einem Dunkel-Licht-Wechsel zeigen und aus diesen Ergebnissen einen Beweis für die Existenz einer Lichtphosphorylierung ableiten. Die Weiterentwicklung der Kenntnisse über die Photophosphorylierungsarten machte es notwendig, den Pa-Abfall erneut zu charakterisieren und in das Photosyntheseschema einzuordnen.

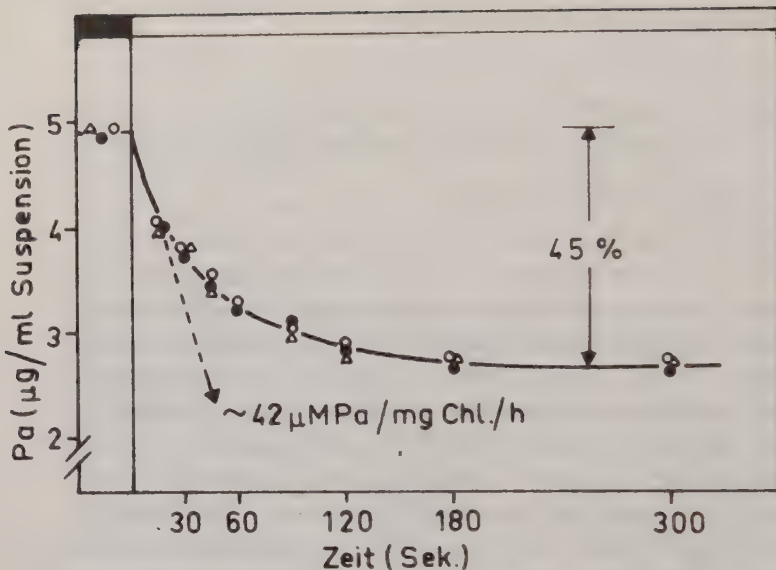


Abb.: 5 Phosphatabfall nach Dunkel-Licht-Wechsel
Begasung: N_2 , Temperatur: 28°C
Lichtintensitäten: (o - o) 1700 Lux
(Δ - Δ) 9700 Lux
($\bullet$ - $\bullet$) 22000 Lux

1. Untersuchungen unter N_2 ohne Zusatz von CO_2

1.1. Einfluß verschiedener Lichtintensitäten

1.1.1. Lichtintensitätsabhängigkeit des anaeroben
Pa-Abfalls

Alle Stoffwechselprozesse, die als Indikatorreaktionen der cyclischen Photophosphorylierung in vivo ange-

sehen werden, zeigen eine Sättigung bei niederen Lichtintensitäten. Es war deshalb das Ziel der vorliegenden Versuche, den lichtinduzierten, anaeroben Pa-Abfall über einen weiten Bereich von Lichtintensitäten zu erfassen und die daraus resultierende Kurve der Lichtabhängigkeit mit derjenigen der Photosynthese zu vergleichen. In Abb. 5 ist der Pa-Abfall nach einem Dunkel-Licht-Wechsel für drei verschiedene Lichtintensitäten dargestellt. Entsprechend den Befunden von Kandler (1957) an *Chlorella* ist der Gehalt an anorganischem Phosphat unter Stickstoff im Dunkeln erhöht. Als Durchschnittswerte aus 13 Einzelversuchen mit Algenmaterial aus 8 verschiedenen Zuchtansätzen ergab sich eine Konzentration von $5,7 \times 10^{-3} \text{ M}$ Phosphat in den Zellen (Tab. 2). Als höchste Konzentration wurde $7,4 \times 10^{-3} \text{ M}$, als niedrigste $4,4 \times 10^{-3} \text{ M PO}_4^{3-}$ gemessen. Santarius und Heber (1965) berichten von noch größeren Schwankungen des Pa-Gehaltes in Chloroplasten, die mit einer nichtwässrigen Methode aus Spinat isoliert wurden. Sie führen den Unterschied von $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ zu $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ auf das Alter und den physiologischen Zustand des verwendeten Materials zurück.

Nach dem Einschalten von Licht wird eine sofort anlaufende Photophosphorylierung durch die schnelle Abnahme des endogenen Phosphatgehaltes erkennbar. Der Mittelwert für die Gesamtverminderung liegt bei etwa 40% des Pa-Gehaltes im Dunkeln. Trotz der festgestellten Schwankungen der Absolutwerte des in der Dunkelperiode vorhandenen Pa erwies sich der Pa-Abfall in den ersten 15 Sekunden nach Einschalten des Lichtes hiervon weitgehend unabhängig (Tab. 2). Kalkuliert man deshalb die Phosphorylierungsgeschwindigkeit durch Anlegen einer Geraden an die 15 Sekunden-Werte, so ergibt sich ein durchschnittlicher Umsatz von

40,3 $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ /mg Chlorophyll und Stunde. Als maximaler Wert wurden 47, als minimaler 33 μM /mg Chl/h ermittelt. Bei diesen Daten handelt es sich jedoch um Mindestwerte, da die Anfangsgeschwindigkeit nach 15 Sekunden bereits durch die sich erhöhende Dephosphorylierung beeinträchtigt wird.

Tabelle 2:

Nr.	hv	Pa	Pa/hv	Pa/hv	Pa/3 Min.	Pa/15 Sek.
		Dunkel	15 Sek.	3 Min.	Δ	Δ
	(Lux)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	(%Pa/Dunkel)	($\mu\text{M}/\text{mgChl/h}$)
1	2100	4,00	3,30	2,25	44	33,0
	4300	3,80	3,10	2,10	45	33,0
	9500	3,90	2,95	2,00	51	45,0
	17000	3,80	3,05	2,10	45	35,5
2	1700	4,85	4,00	2,65	45	40,2
	9700	4,95	3,95	2,75	44	47,0
	22000	4,95	4,05	2,75	44	42,6
3	8500	6,40	5,50	4,05	37	42,6
4	10000	6,20	5,40	4,30	31	37,8
5	8500	6,40	5,50	4,95	23	42,6
6	1500	4,90	4,00	3,50	29	42,6
7	1700	5,50	4,75	3,60	35	35,5
8	1700	4,95	3,95	3,35	33	47,0
$\emptyset$					39	40,3

Begasung: N_2 , Temperatur: 28°C , 1 ml Algensuspension = 165 μg Chlorophyll = 28 μl p.c.

Alle verwendeten Lichtintensitäten liegen im Sättigungsbereich.

In Abb. 7 sind die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die eingestrahlte Lichtintensität aufgetragen. Die Sättigung der unter anaeroben Bedingungen gemessenen Photo-phosphorylierung wird bei Intensitäten ≤ 2000 Lux erreicht. Die von Kandler (1957) unter ähnlichen Bedingungen, aber mit verarmten Chlorellen durchgeführten Experimente konnten damit bestätigt werden.

1.1.2. Lichtintensitätsabhängigkeit der Photosynthese

Angaben über die für die Photosynthese sättigend wirkenden Lichtintensitäten weisen je nach den Versuchsbedingungen unterschiedliche Werte auf. So konnte Loos (1967) an Chlorella zeigen, daß bei niederen Algendichten 10000 bis 20000 Lux sättigend sind, während bei einer Zunahme der Algenkonzentration im Versuchsan-satz eine Verschiebung zu höheren Intensitäten auftritt. Damit erwies es sich als notwendig, eigene Experimente zur Ermittlung der Lichtabhängigkeit der Photosynthese durchzuführen, um einen möglichst direkten Vergleich mit der Lichtintensitätskurve des Pabfalls zu gewährleisten. In Abb. 6 ist die Kurvenschar eines Experiments zur Zeitabhängigkeit der CO_2 -Fixierung bei verschiedenen Lichtintensitäten dargestellt. Die CO_2 -Assimilationsraten aus mehreren dieser Experimente wurden in Abb. 7 zur Lichtintensität in Bezug gesetzt.

1.1.3. Lichtintensitätsabhängigkeit der anaeroben Glucoseassimilation

Versuche von Myers (1947) an Chlorella und von Taylor (1951) an Scenedesmus hatten ergeben, daß autotrophe Grünalgen zu oxydativer Assimilation von Glu-

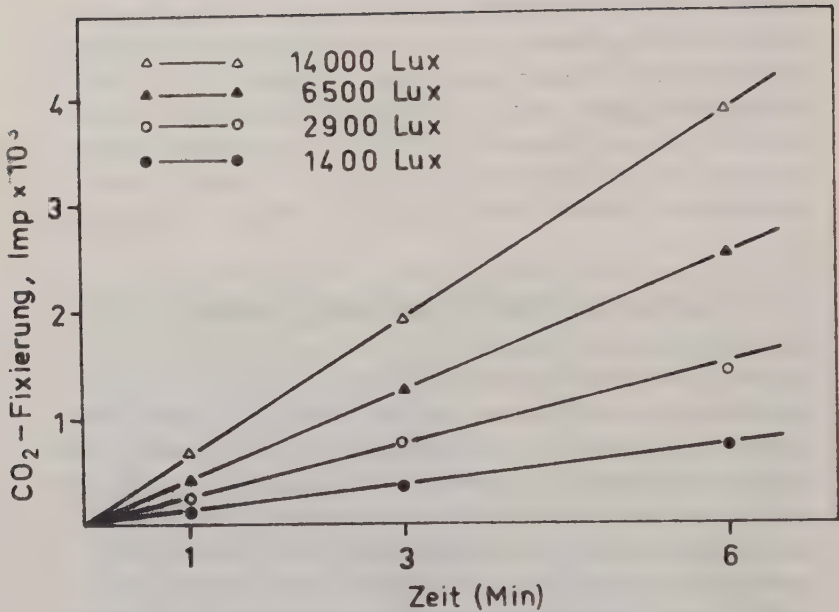


Abb.: 6 Kinetik der photosynthetischen CO₂-Fixierung bei verschiedenen Lichtintensitäten

cose befähigt sind. Ein vermehrter Glucoseeinbau allein durch eine Lichtphosphorylierung konnte von Kandler bewiesen werden. In umfangreichen Untersuchungen wurde die mögliche Anwendung der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation als Testreaktion für die cyclische Photophosphorylierung erkannt (Kandler 1966). Eines der untersuchten Kriterien war die im Unterschied zur Photosynthese frühe Lichtsättigung der Glucoseassimilation (Tanner et al. 1965 u. 1966). Die Messung der Lichtabhängigkeit der Glucoseaufnahme sollte demnach eine weitere Vergleichsmög-

lichkeit für die Lichtabhängigkeit des anaeroben Pa-Abfalls darstellen und zu seiner Einordnung in das Photosyntheseschema beitragen. Die Ergebnisse zur Lichtsättigung der Glucoseassimilation sind in Tabelle 3 dargestellt und zum Vergleich mit der Photosynthese und dem Pa-Abfall in Abb. 7 eingetragen.

Tabelle 3:

Exp.- Nr.	Versuchs- zeit (Min.)	Lichtin- tensität (Lux)	assimilier- te Glucose ($\mu\text{g/ml}$)	assimilier- te Glucose ($\mu\text{M/mgChl/h}$)
1	25	1800	168,5	13,2
	25	4100	236,0	18,5
	25	8800	267,0	21,7
	25	18000	264,5	21,4
2	20	1000	101,0	9,9
	20	2300	161,0	15,8
	20	4800	213,0	21,7
	20	9500	218,0	22,2
	20	19000	208,0	21,2

Die Lichtsättigung der anaeroben Glucoseassimilation tritt zwischen 3000 und 4000 Lux Weißlicht ein. Da sowohl die Glucoseaufnahme als auch der Pa-Abfall unter denselben Bedingungen gemessen wurden, ist ein quantitativer Vergleich beider Prozesse möglich. Errechnet man den Mittelwert der maximalen Zuckeraufnahme aus den Werten, die bei Intensitäten > 4500 Lux erhalten wurden, so ergibt sich eine Rate von $21,6 \mu\text{M/mgChl./h}$. Nach Tanner et al. (1966) werden 85% der assimilierten Glucose in Oligo- und Polysaccharide eingebaut. Nur 1% wurde als freie Glucose in den Zellen wiedergefunden. Da nach den heutigen Vorstellungen für die Aufnahme und den Einbau eines Moleküls Glucose in

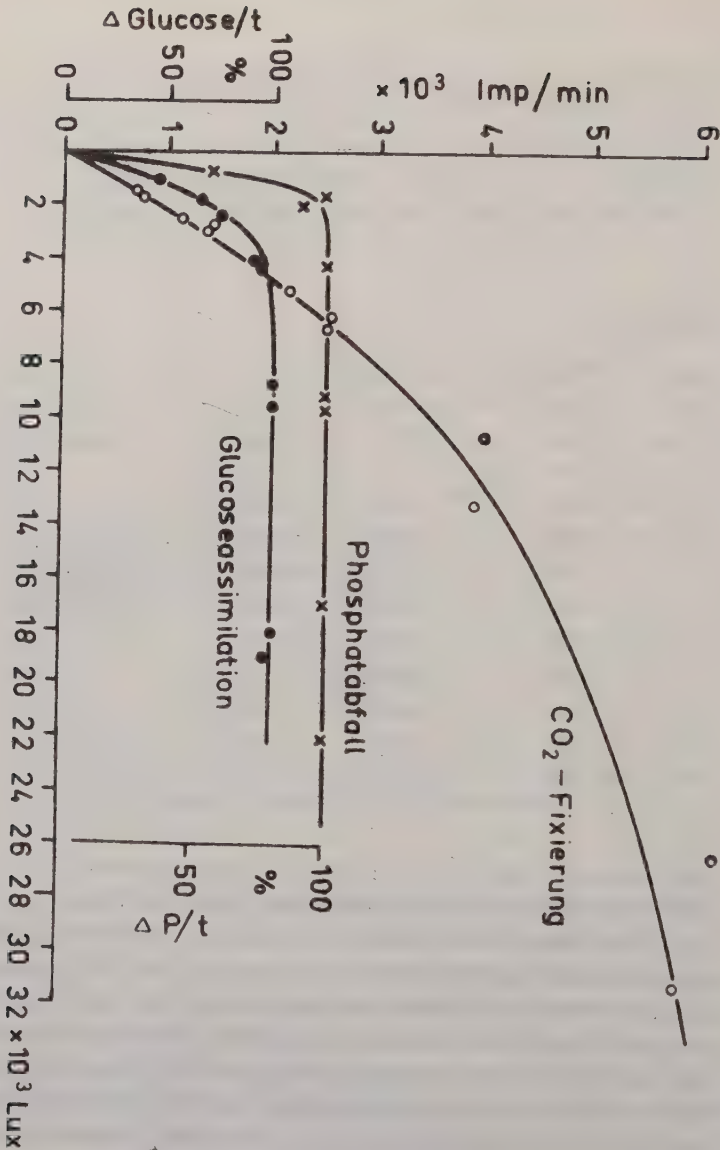


Abb. 7: Vergleich der Lichtintensitätskurven von Photosynthese, Glucoseassimilation und Pa-Abfall

Oligo- u. Polysaccharide 2,5 Moleküle ATP benötigt werden (M. Decker u. W. Tanner, in Vorbereitung), kann aus der Glucoseaufnahme auf die Bildungsrate von ATP durch die cyclische Photophosphorylierung geschlossen werden. Es ergeben sich folgende Werte:

ca. 46 $\mu\text{M ATP/mgChl./h}$ aus 85% der Glucoseassimilation (unberücksichtigt blieben 1 ATP/Glucose für die Aufnahme der verbleibenden 15%)

ca. 40 $\mu\text{M ATP/mgChl./h}$ aus der Anfangsgeschwindigkeit des Pa-Abfalls

Da die anaerobe lichtabhängige Glucoseassimilation von der cyclischen Photophosphorylierung getrieben wird, könnte diese Lichtreaktion auch für den anaeroben Pa-Abfall ausreichen.

1.1.4. Diskussion und Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Autoren

Beim direkten Vergleich der Intensitätsabhängigkeit zeigt sich deutlich, daß die Lichtsättigung der Photosynthese von der des Pa-Abfalls sowie der Glucoseassimilation verschieden ist. Für die Photosynthese wurde eine Kurve erhalten, die bis etwa 8000 Lux nahezu linear ansteigt. Gegen höhere Lichtintensitäten tritt eine Verflachung auf, die auf die Schichtdicke der Algen im Versuchsgefäß zurückzuführen sein dürfte. Ein scharfer Knick der Kurve, wie er am Punkt der Sättigung auftreten sollte, ist nur bei sehr dünnen Suspensionen zu erreichen. Bei dichteren Suspensionen verschiebt sich die Sättigung zu höheren Intensitäten, wobei die Kurve in einem größeren Bereich gekrümmt er-

scheint. Der Zusammenhang von Algendichte und Lichtsättigung an Chlorellen wurde 1967 von Loos eingehend untersucht. Bei einer Dichte von 0,34, die der in den vorliegenden Versuchen verwendeten sehr nahe kommt, war die photosynthetische CO_2 -Fixierung bei etwa 20000 Lux gesättigt, wobei bei 10000 Lux bereits ca. 70% der maximalen Fixierungsrate erreicht war. Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit dem eigenen Kurvenverlauf. Ebenfalls für Chlorella wurde von Tanner et al. (1965) eine Sättigungskurve der Sauerstoffproduktion erstellt, die bis 6000 Lux linear verläuft. Die Kurve der Lichtabhängigkeit, die von van Rensen (1969) für die O_2 -Entwicklung an Scenedesmus gezeigt wurde, weist ebenfalls ab 7000 Lux eine zunehmende Verflachung auf und erreicht erst bei Intensitäten > 20000 Lux die größten gemessenen Raten. Die Sättigung der CO_2 -Fixierung an Ankistrodesmus (Urbach et al. 1970) erscheint etwa bei 10000 Lux erreicht zu sein. Aus den Daten der Literatur kann eine gute Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen abgeleitet werden.

Der zu charakterisierende anaerobe Pa-Abfall zeigt in Anlehnung an die Glucoseassimilation eine andere Charakteristik der Lichtabhängigkeit und dokumentiert damit seine Unabhängigkeit vom nichtcyclischen Elektronentransport. Bereits Kandler (1957) nahm die Sättigung des Pa-Abfalls bei Intensitäten ≤ 1000 Lux Weißlicht an. In der vorliegenden Untersuchung konnte die Sättigung für Intensitäten ≤ 2000 Lux bewiesen werden. Entsprechend diesen Befunden ist der Pa-Abfall einer Reihe gut untersuchter Stoffwechselprozesse zuzuordnen, die ebenfalls eine im Vergleich zur Photosynthese frühe Lichtsättigung aufweisen und somit ihre Abhängigkeit von Photosystem I bekunden. Die Hemmung der Atmung durch Licht, der sog. Kokey-

fekt, wird von Photosystem I bewirkt und erreicht sein Maximum bei etwa dem 1 bis 2fachen Wert der Kompensation (Hoch et al. 1963). Der von Ried (1965) beschriebene "transient T_3 ", entspricht dem Kokeffekt. Die gemessene Sättigung war bei 1/10 der Lichtintensität erreicht, die für die Photosynthese notwendig war. Die Synthese eines Enzyms, der Isocitrat-Lyase kann mit ATP aus dem Photosystem I betrieben werden. Die Lichtsättigung dieses Prozesses entspricht der der anaeroben Glucoseassimilation (Syrett 1966). Die Glucoseassimilation selbst erreicht in Chlorella-Zellen bei etwa 1 - 2000 Lux Weißlicht (Tanner et al. 1965) und 10000 erg/cm². sec. verschiedener Wellenlängen ihre größte Rate (Tanner et al. 1966). Die anaerobe Aufnahme von Chlorid in Elodea zeigt bereits bei 1000 erg/cm². sec. im Hellroten den sättigenden Wert. Der P^{32} -Einbau in die organische Phosphatfraktion von Ankistrodesmus unter N_2 ist ebenfalls bereits sehr früh, bei Intensitäten $\leq$ 1000 Lux gesättigt. Da allen diesen Prozessen der Ablauf der cyclischen Photophosphorylierung zugrundegelegt wird, erscheint es wahrscheinlich, daß der anaerobe lichtinduzierte Pa-Abfall auch auf die alleinige Tätigkeit von Photosystem I zurückgeführt werden kann. Der direkte Vergleich der Glucoseassimilation und des Pa-Abfalls unter identischen experimentellen Bedingungen erbrachte nicht, wie erwartet, eine gleichzeitige Sättigung beider Prozesse. Während der Pa-Abfall ab 2000 Lux keine weitere Steigerung mehr erfährt, erreicht die Glucoseassimilation hier nur etwa 70% der bei 4000 Lux erreichten maximalen Einbaurate. Diese Beobachtung ändert nichts an der qualitativen Aussage einer frühen Sättigung für beide Prozesse im Vergleich zur bedeutend späteren Lichtsättigung der Photosynthese. Als eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte ein Literatur-

hinweis von Bedeutung sein. Tanner et al. (1969) fanden, daß die bei 2000 Lux eingetretene Sättigung der Glucoseassimilation durch Zugabe von CCP nach 4000 - 5000 Lux verschoben wurde. Da nach Heytler (1962) CCP die ATP-ase-Tätigkeit stimuliert, stehen pro Zeiteinheit mehr ADP für die Phosphorylierung zur Verfügung als in der unvergifteten Kontrolle. Durch eine Steigerung der Lichtintensität kann der ATP-Verlust ausgeglichen werden. Die Glucoseassimilation, die bei CCP-Zugabe eine deutliche Hemmung aufwies, erreichte wieder ihre Höchststrate, nun jedoch bei einer höheren Lichtintensität.

Beim anaeroben Pa-Abfall sollte ebenfalls die in der Zelle vorhandene ADP-Menge die Geschwindigkeit der Photophosphorylierung bestimmen, wobei die Dephosphorylierungsreaktionen den ADP-pool regulieren. Induziert man durch Zugabe von Glucose eine weitere Möglichkeit der Dephosphorylierung, so stehen in Analogie zu den CCP-Ergebnissen von Tanner et al. mehr ADP für die Phosphorylierung zur Verfügung. Durch Erhöhung der Lichtintensität kann dieses ADP-Angebot ausgenützt werden. Damit wäre aber eine Erhöhung der Lichtsättigung verbunden.

1.2. Untersuchung des Pa-Abfalls mit unterschiedlichen Lichtqualitäten

Eine erhebliche Zunahme des Quantenbedarfs der Photosynthese wurde im monochromatischen Licht beim Übergang vom kurzwelligen zum langwelligen Rotbereich sowohl für in vitro Systeme (Sauer et al. 1965; Schwartz 1967), als auch bei Verwendung ganzer Zellen gefunden (Emerson u. Lewis 1943; Tanada 1951; Loos 1967). Demgegenüber erreichen Meßverfahren, die die cyclische Photophosphorylierung in vitro erfassen bei Wellenlängen > 680 nm die größten Raten. (Hoch et al. 1963/b;

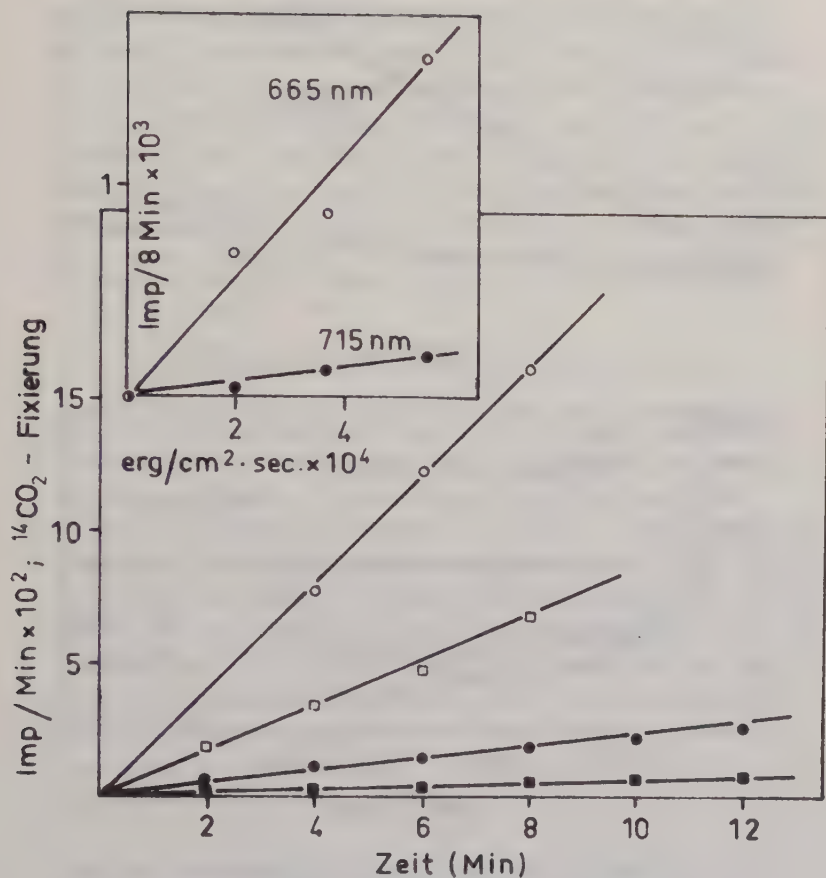


Abb. 8a: Kinetik der ¹⁴CO₂-Fixierung bei 665 nm und 715 nm

55600 erg/cm².sec: (o - o) 665 nm;

(● - ●) 715 nm;

20300 erg/cm².sec: (□ - □) 665 nm;

(■ - ■) 715 nm;

8b: Lichtintensitätsabhängigkeit der Photosynthese bei 665 nm und 715 nm

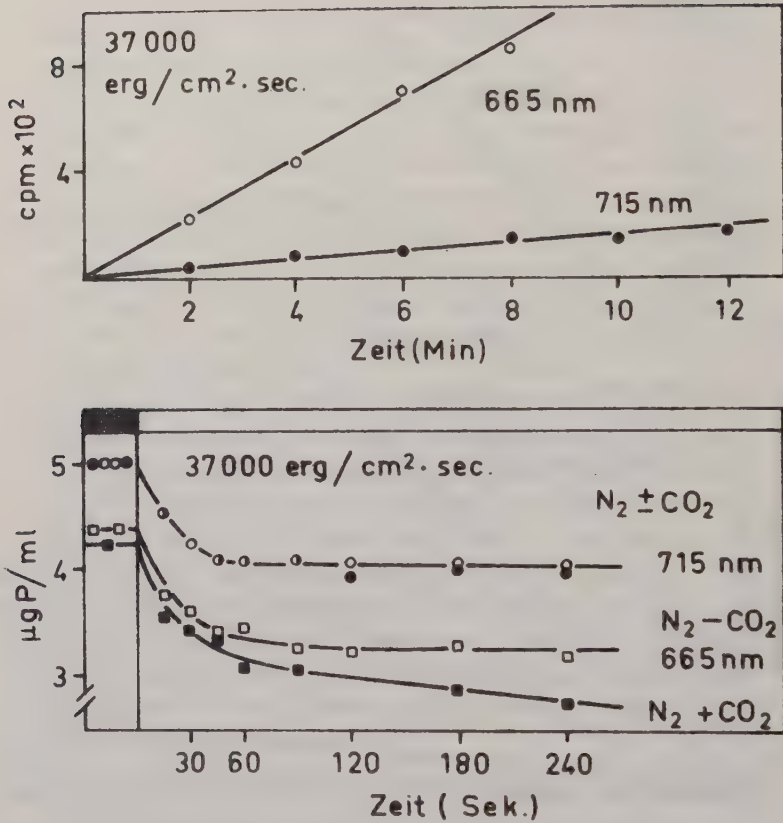


Abb. 9: Direkter Vergleich von Photosynthese und Pa-
Abfall bei verschiedenen Wellenlängen

Sauer et al. 1965; Arnon 1967). Diese Eigenschaften von Photosystem I konnten mehrere Autoren in vivo bestätigen. Wiessner (1965) zeigte einen Anstieg der Quantenausbeute im langwelligen Bereich auf das 1,4-fache der Ausbeute im kurzwelligen bei der Aufnahme von Acetat in *Chlamydomonas*. Tanner et al. (1966) fanden im Gegensatz zur Photosynthese keine Ver-

schlechterung der Glucoseaufnahme bei 715 nm an Chlorella. Untersuchungen zur Quantenausbeute (Tanner et al. 1968) erbrachten ebenfalls eine Zunahme auf den 1,4-fachen Wert im Dunkelroten. Bishop (1967) fand unter den gleichen Bedingungen für die Photoreduktion an Scenedesmus eine Erhöhung um den Faktor 1,35. Es sollte demnach durch die Verwendung monochromatischen Lichtes eine weitere Möglichkeit gegeben sein, die Zugehörigkeit des Pa-Abfalles zu Photosystem I zu überprüfen.

1.2.1. Die Photosynthese bei 665 nm und 715 nm

Um den möglichst direkten Vergleich zwischen Photosynthese und Pa-Abfall zu gewährleisten, wurde die CO_2 -Fixierung bei verschiedenen Lichtintensitäten beider Wellenlängen gemessen. In Abb. 8 sind Kinetiken für Intensitäten von 55600 und 20300 $\text{erg/cm}^2\cdot\text{sec}$ dargestellt. Es zeigt sich deutlich, daß im Dunkelrotbereich die Photosynthese nur $1/8$ des Wertes erreicht, der bei 665 nm gemessen wurde. Die Intensitätsabhängigkeit der Photosynthese für beide Wellenlängen (Abb. 8) läßt erkennen, daß die vorliegenden Messungen noch im linearen Teil der Lichtsättigungskurve durchgeführt wurden.

1.2.2. Der anaerobe Pa-Abfall bei 665 nm und 715 nm

Für die Durchführung der Versuche wurde eine Intensität von 37000 $\text{erg/cm}^2\cdot\text{sec}$ ausgewählt. Damit war durch die vorausgehenden Experimente das Verhalten der Photosynthese als Vergleichsmaßstab bereits eindeutig festgelegt. Ein Versuch, bei dem mit Algenmaterial aus demselben Kulturansatz gleichzeitig die Photosynthese und der Pa-Abfall gemessen wurde, ist in Abb. 9 wiedergegeben. Ein deutlicher Unterschied in der Wirk-

samkeit der gewählten Wellenlängen auf die Photosynthese ist wiederum erkennbar. Wie erwartet zeigen die Kurven für den Pa-Abfall unter N_2 , also unter Bedingungen der cyclischen Photophosphorylierung sowohl für 715 nm als auch für 665 nm einen annähernd identischen Verlauf. Bei kritischer Betrachtung kann der vorliegende Versuch jedoch nur als Hinweis auf eine frühe Lichtsättigung des anaeroben Pa-Abfalls gewertet werden. Er bestätigt damit die Ergebnisse, die bei der Einstrahlung von Weißlicht erhalten wurden. Lediglich Messungen von Quantenausbeuten, die nur im linearen Teil der Lichtsättigungskurve bei sehr niederen Intensitäten möglich gewesen wären, hätten exakte Rückschlüsse auf die Beteiligung verschiedener Pigmentsysteme am Pa-Abfall erlaubt. Solche Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt. Aus Farblichtversuchen kann zusammenfassend die Vermutung abgeleitet werden, daß der anaerobe Pa-Abfall wahrscheinlich ebenso wie die Glucoseassimilation, die Acetataufnahme und die Photoreduktion insbesondere durch das von Licht der Wellenlänge > 680 nm angeregte Photosystem I betrieben wird.

1.3. Der anaerobe Pa-Abfall in Photosynthese-Mutanten

Eine weitere Möglichkeit der Zuordnung des Pa-Abfalls zu den beiden Lichtreaktionen ergibt sich bei der Verwendung von Mutanten. Insbesondere die von Bishop (1962) isolierte Mutante Nr. 11 des Wildstammes *Scenedesmus obliquus* D₃ war von Interesse, da sie nur noch den cyclischen Elektronentransportweg, nicht aber die Möglichkeit zur photosynthetischen Wasserspaltung besitzt (Bishop u. Weaver 1963). Ihre Befähigung zur cyclischen Photophosphorylierung wurde durch Messung der Photoreduktion und der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation belegt (Bishop 1962; Tanner et al. 1967).

Wenn die Ursache für die Abnahme des Pa im Licht ebenfalls nur auf die Anregung von Photosystem I zurückgeführt werden kann, so sollte diese Mutante eine deutliche Verminderung des Phosphatgehaltes beim Einschalten von Licht erkennen lassen.

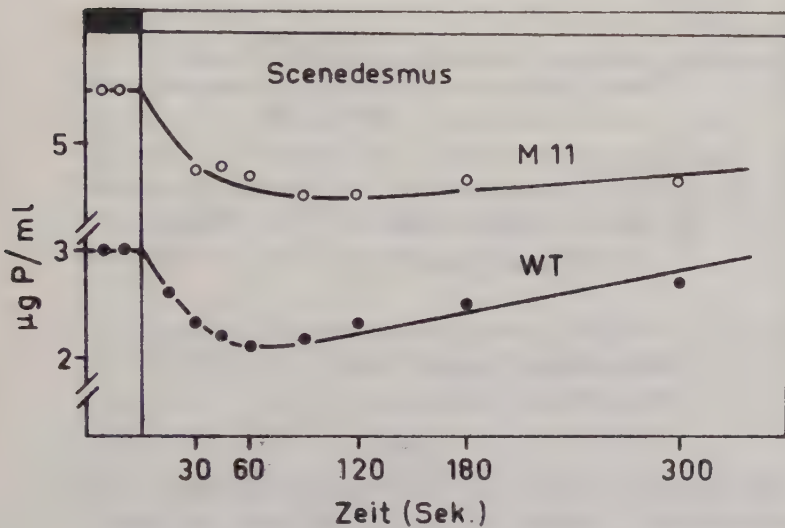


Abb. 10: Anaerober Pa-Abfall in Mutante 11 und Scenedesmus Wildstamm

Schichtdicke der Algen: 1 cm; T = 20°C;

Beleuchtung: 50000 Lux

In Versuchen, bei denen als Vergleich zur Mutante 11 der Wildstamm anstelle von Chlorella herangezogen wurde, konnte eindeutig ein auch quantitativ gut übereinstimmender Pa-Abfall im Dunkel-Licht-Wechsel für beide Organismen nachgewiesen werden (Abb. 10). Da diese Versuche in Küvetten ausgeführt worden sind, wurde ein den Chlorella-Experimenten entsprechender Dunkel-

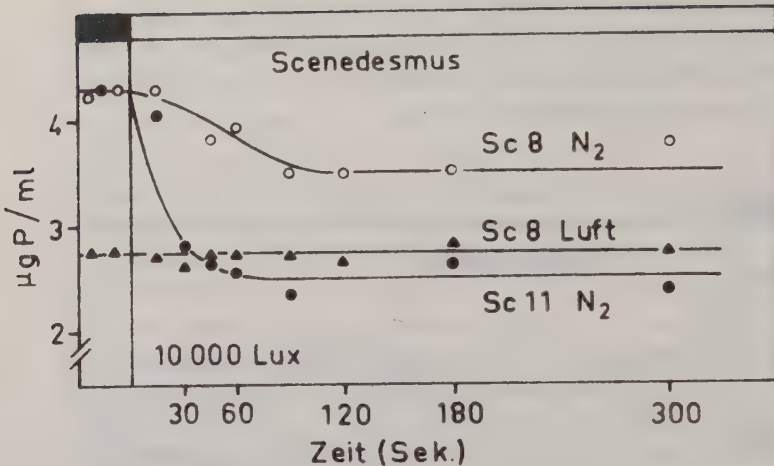


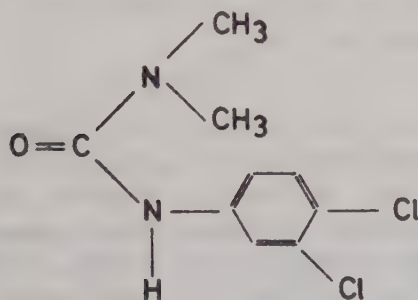
Abb. 11: Phosphatspiegelschwankungen in Mutante 11 und 8 unter N₂ und Luft
Bedingungen wie bei Abb. 5

Licht-Wechsel mit der üblichen Versuchsanordnung für diese Mutante in Abb. 11 eingetragen. Hier ist eine deutliche Parallelität zu den für Chlorella früher erhaltenen Kurvenverläufen erkennbar. Diese Experimente dienen als wesentlicher Hinweis für die alleinige Beteiligung von Photosystem I am anaeroben Pa-Abfall.

An der Mutante 8 (Bishop 1962) konnte bisher keine Lichtphosphorylierung nachgewiesen werden. Sie ist nur zu einer geringfügigen Hill-Reaktion mit Chinon, nicht aber zur photosynthetischen CO₂-Fixierung, zur Photoreduktion oder zur Glucoseassimilation im Licht unter N₂ befähigt. Sie sollte als Kontrolle für die Versuche mit der Mutante 11 dienen und entsprechend ihren Eigenschaften keine Pa-Spiegelschwankungen zu Beginn der Lichtperiode aufweisen. Drei Versuche be-

wiesen jedoch die Existenz einer langsamen Pa-Abnahme nach Einschalten der Beleuchtung. Eine Erklärung dieses Phänomens ergibt sich aus der lichtabhängigen Gärungsstimulierung, die Hirt (1971) speziell an Mutante 8 nachwies. Die Zunahme phosphorylierter Glykolyse-Zwischenprodukte im Licht findet zweifellos ihren Niederschlag in der Verminderung des endogenen Pa-Gehaltes der Mutante. Im aeroben Dunkel-Licht-Wechsel wurde im Gegensatz zu Chlorella nie eine Veränderung des Pa-Gehalts beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung einer lichtstimulierten Gärung in der Mutante 8. Die Kurven für eine aerobe und eine anaerobe Pa-Änderung dieser Mutante im Dunkel-Licht-Wechsel sind in Abb. 11 dargestellt.

1.4. Einfluß von DCMU auf den anaeroben Pa-Abfall



3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff

DCMU, ein Abkömmling des Phenylurethans wird als typischer Hemmstoff der II. Lichtreaktion (Wessels et al. 1956; Bishop 1958) zur Trennung der beiden Lichtphosphorylierungen benutzt. Die nichtcyclische Phos-

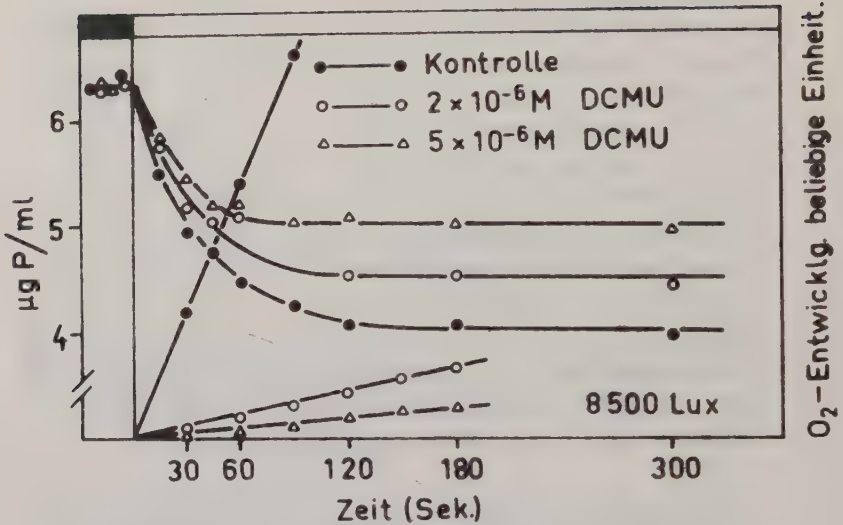


Abb. 12: Einfluß von $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ und $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ DCMU auf den anaeroben Pa-Abfall und die O₂-Entwicklung in Chlorella

phorylierung und die Photosynthese sind im Gegensatz zur cyclischen Photophosphorylierung bereits bei niederen Konzentrationen hemmbar (Übersicht bei Losada und Arnon 1963). In der Verwendung dieses Hemmstoffes wurde eine zusätzliche Möglichkeit gesehen, die bisherige Zuordnung des Pa-Abfalls zu Photosystem I zu überprüfen. In Abb. 12 ist das Verhalten der Pa-Spiegel-Schwankungen und der photosynthetischen O₂-Entwicklung bei zwei verschiedenen DCMU-Konzentrationen dargestellt. Die Photosynthese unterliegt bei $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ und $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ DCMU bereits einer Hemmung von $\geq 90\%$. Dagegen wurde die Anfangsgeschwindigkeit des Pa-Abfalls nur auf ca. 60% bei $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ und auf etwa 50% bei $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ DCMU vermindert. Das steady-state-Niveau des Pa-Gehaltes ist im Licht ebenfalls weniger beeinträch-

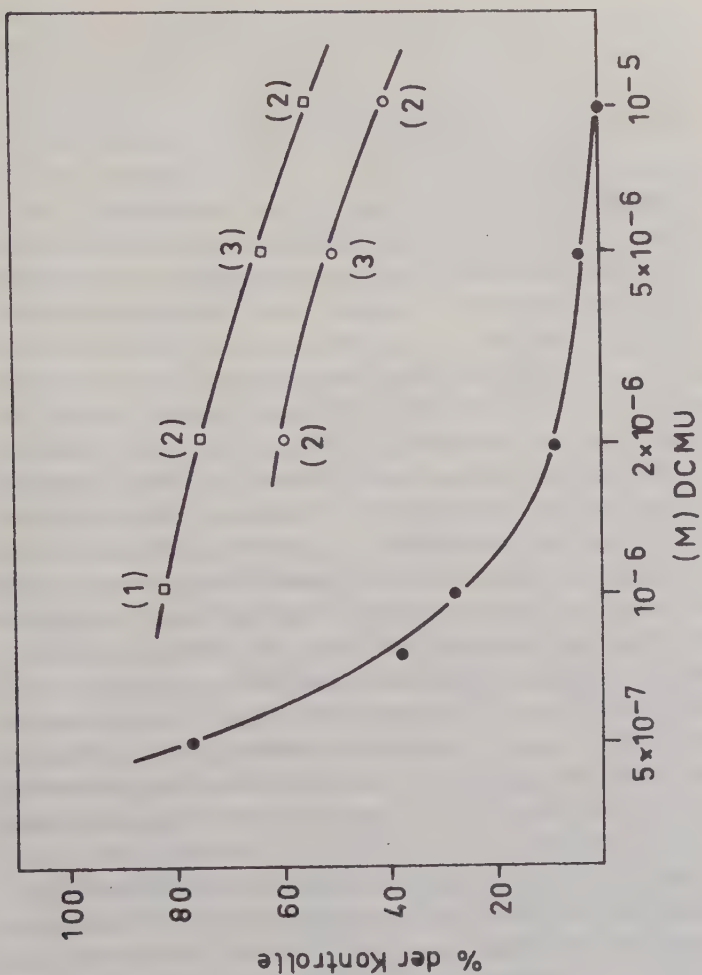


Abb. 13: DCMU-Konzentrationsabhängigkeit der Photosynthese und des Pa-Abfalls in Chlorella
 (● - ●) Photosynthetische O_2 -Entwicklung
 (○ - ○) Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit des Pa-Abfalls
 (□ - □) Hemmung der Gesamtabnahme des Pa-Gehaltes

tigt als die Photosynthese. So werden bei den obigen Konzentrationen noch 80 bzw. 60% des ungehemmten Gesamtabfalles erreicht. Eine Übersicht der Hemmwirkung ist bei Erfassung eines weiten Konzentrationsbereichs in Abb. 13 gegeben. Die dort gezeigten Kurven stehen in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben, die für den direkten Vergleich der Photosynthese mit verschiedenen Indikatorreaktionen der cyclischen Photophosphorylierung vorgefunden wurden. Dies gilt insbesondere für die Ergebnisse von Tanner et al. (1966) an der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation in *Chlorella*. Für $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ DCMU wird eine Hemmung von 50% im Weißlicht, von 60% für 665 und 715 nm gezeigt. Die O_2 -Entwicklung war ab $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ bereits völlig gehemmt. Die gleiche DCMU-Empfindlichkeit wurde für die O_2 -Produktion an *Scenedesmus* (v. Rensen 1969) und die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung an *Ankistrodesmus* (Urbach et al. 1970) festgestellt. Der anaerobe ^{32}P -Einbau in die organische Phosphatfraktion, der als Test der cyclischen Photophosphorylierung verwendet wird, zeigt bei $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ DCMU noch 60% der ungehemmten Kontrollrate. Der Einbau von ^{32}P in Polyphosphate unter N_2 wird ebenfalls der cyclischen Phosphorylierung zugeschrieben. Van Rensen (1969) fand eine nur 10%ige Hemmung dieses Prozesses bei $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ DCMU im Weißlicht. In *Ankistrodesmus* war dasselbe Testverfahren bei niederen Intensitäten der Wellenlänge 715 nm völlig unempfindlich gegenüber $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ DCMU (Ullrich et al. 1969). Die anaerobe, lichtabhängige Polysaccharidsynthese in *Chlorella* wird sogar von der hohen Konzentration von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ nicht beeinflusst. (Glagoleva et al. 1970). Forti et al. (1963) berichten von einem lichtabhängigen Anstieg des ATP-Gehaltes in Spinat- und Steinbrechblättern unter N_2 in Gegenwart von $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ DCMU. Kylin (1967) bestätigte diesen Effekt bei der Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ an der Alge *Scenedesmus*. Eine weitere Meßmethode der cyclischen Photo-

phosphorylierung, die Erfassung der Photoreduktion, ist über längere Zeit nur in Gegenwart von DCMU möglich, um eine Inaktivierung der Hydrogenase durch die Sauerstoffproduktion von Photosystem II zu verhindern.

Aus der Unempfindlichkeit der Pa-Spiegel-Schwankungen gegenüber DCMU muß deshalb der Schluß gezogen werden, daß der anaerobe, lichtabhängige Pa-Abfall von der cyclischen Photophosphorylierung und damit von Photosystem I ausgeführt wird. Eine kurze Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse unter N_2 ohne CO_2 läßt folgendes Bild entstehen. Die Lichtsättigung des anaeroben Pa-Abfalls ist bereits sehr früh, bei etwa 2000 Lux erreicht. Auch bei Einstrahlung der Wellenlänge 715 nm läuft die Reaktion unvermindert ab. Die Photosynthese hingegen zeigt maximale CO_2 -Fixierungsraten erst bei Lichtintensitäten > 10000 Lux und erreicht unter 715 nm nur etwa $1/8$ der Rate, die bei 665 nm gemessen wird. Eine nicht zur Photosynthese befähigte Mutante besitzt die Möglichkeit zur lichtgetriebenen Pa-Erniedrigung im gleichen Maße wie der Wildstamm. Schließlich wird durch DCMU-Konzentrationen, die eine photosynthetische O_2 -Entwicklung völlig ausschalten, eine Pa-Abnahme nur geringfügig beeinträchtigt. Die Summe der übereinstimmenden Ergebnisse aus den getrennt untersuchten Eigenschaften kennzeichnen den anaeroben, lichtabhängigen Pa-Abfall, nach dem Vergleich mit verschiedenen Indikatorreaktionen der cyclischen Photophosphorylierung als eindeutig dem Photosystem I zugehörig.

2. Der Pa-Abfall unter N_2 mit Zusatz von CO_2

Bereits 1957 hatte Kandler gezeigt, daß der Zusatz von CO_2 zu anaerob im Dunkeln gehaltenen Algen keinen Unterschied in der Steigung des Pa-Abfalls bewirkt, wenn

Weißlicht der Intensität 7000 Lux eingestrahlt wird. Das steady-state Pa-Niveau lag jedoch bei Gegenwart von CO_2 um etwa 15% niedriger als bei CO_2 -Entzug. Der Einfluß von Kohlensäure erklärt sich vermutlich durch die Anhäufung der Zuckerphosphate während der CO_2 -Assimilation. Um diese Daten auch für das gegenwärtig verwendete System zu bestätigen, wurde ein Versuch durchgeführt, der den Pa-Abfall mit und ohne Zusatz von CO_2 bei 1700 Lux vergleicht (Abb. 14).

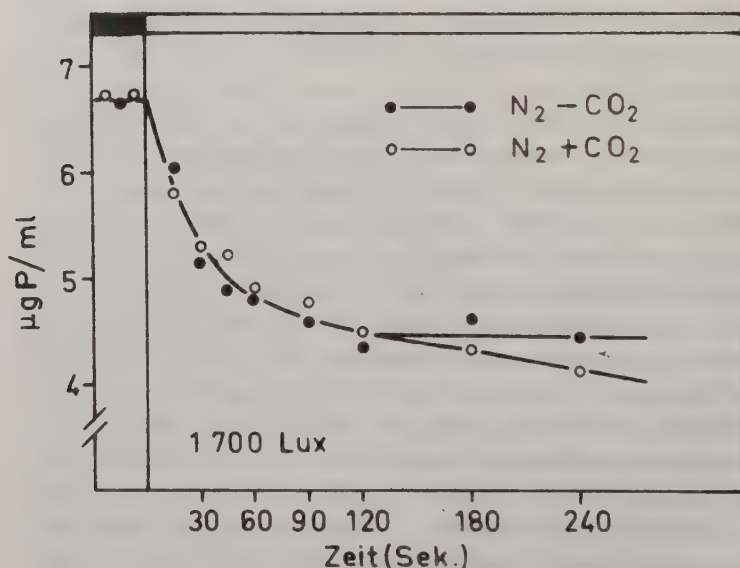


Abb. 14: Einwirkung von CO_2 auf den anaeroben Pa-Abfall

Wie schon bei den Farblightversuchen ist auch hier festzustellen, daß CO_3^{2-} im Medium keine meßbare Änderung der Pa-Abnahme-Geschwindigkeit im Dunkel-Licht-Wechsel verursacht. Ein tieferes Niveau im steady-state-Bereich ist bei der geringen Photosyntheseleistung der

Zelle nur angedeutet, war bei $57000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec.}$ der Wellenlänge 665 nm jedoch gut ausgeprägt (Abb. 9). Dieser Versuch bestätigt die von Kandler an verarmten Algen festgestellte CO_2 -Unempfindlichkeit der Geschwindigkeit des Pa-Abfalls auch für frisch geerntete Zellen und verweist somit wiederum auf die Zugehörigkeit des Pa-Abfalls zur cyclischen Photophosphorylierung.

3. Untersuchungen des Pa-Abfalls unter aeroben Bedingungen

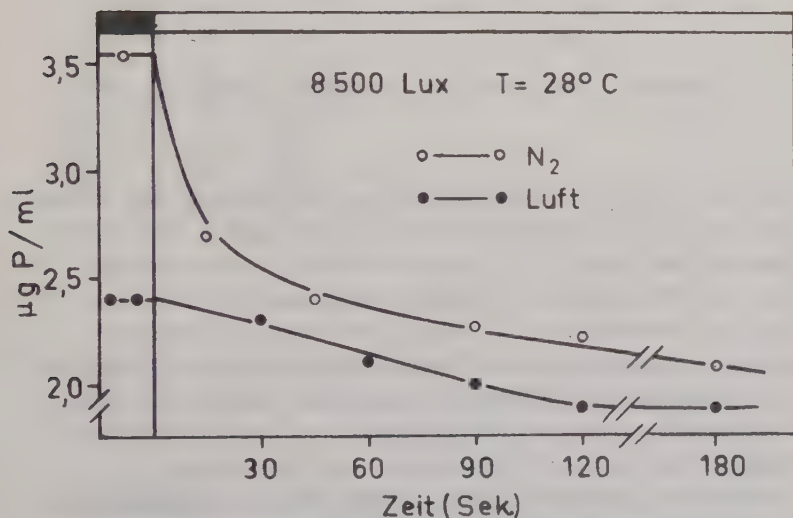


Abb. 15: Vergleich des anaeroben und des aeroben Pa-Abfalls unter identischen Bedingungen

Bei Begasung mit Luft betreiben autotrophe Organismen Photosynthese. Entsprechend dem von Calvin erarbeiteten Schema sind hierbei beide Photophosphorylierungen in stöchiometrischem Verhältnis tätig, wobei bei einer durchschnittlichen Assimilationsleistung von $180 \mu\text{M CO}_2/\text{mg Chl.}/\text{h}$ etwa $540 \mu\text{M ATP}/\text{mg Chl.}/\text{h}$ gebildet werden müssen. Ein solcher Umsatz - die Atmung leistet im Vergleich hierzu weniger als 10% - sollte insbesondere in der Induktionsphase nach einem Dunkel-Licht-Wechsel sichtbare Änderungen im Adenylatsystem und dem damit verbundenen Pa-Spiegel hinterlassen. Versuche, solche Änderungen des Pa-Gehaltes zu erfassen und durch gezielte Auswahl der Bedingungen zu charakterisieren, werden im folgenden Teil der Arbeit berichtet.

5.1. Direkter Vergleich des Pa-Abfalls unter N_2 und Luft

Das Ziel dieser Versuche war es, den aeroben und anaeroben Pa-Abfall unter identischen Bedingungen bei Verwendung des gleichen Algenmaterials zu untersuchen und die Unterschiede im Ausgangsniveau und der Steigung zu demonstrieren. In Abb. 15 ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt. Die Algen enthalten unter N_2 im Dunkeln $3,55 \mu\text{g P}/\text{ml}$ Suspension, unter Luft jedoch nur $2,4 \mu\text{g P}/\text{ml}$. Das bedeutet einen Anstieg des Dunkel/ O_2 -Gehaltes auf 148% unter N_2 . Eine gute Übereinstimmung ergibt sich diesbezüglich mit den Kurven von Kandler (1957), aus denen sich eine Erhöhung auf 156% errechnet. Der aerobe Pa-Abfall erzielt in seiner Anfangsgeschwindigkeit einen Pa-Verbrauch von etwa $40 \mu\text{M Pa}/\text{mg Chl.}/\text{h}$ und erreicht den Mittelwert der auf Seite 38 aufgezeigten Versuche. Unter Luft wird eine linear verlaufende Pa-Abnahme beobachtet, wobei die Geschwindigkeit weit unter der

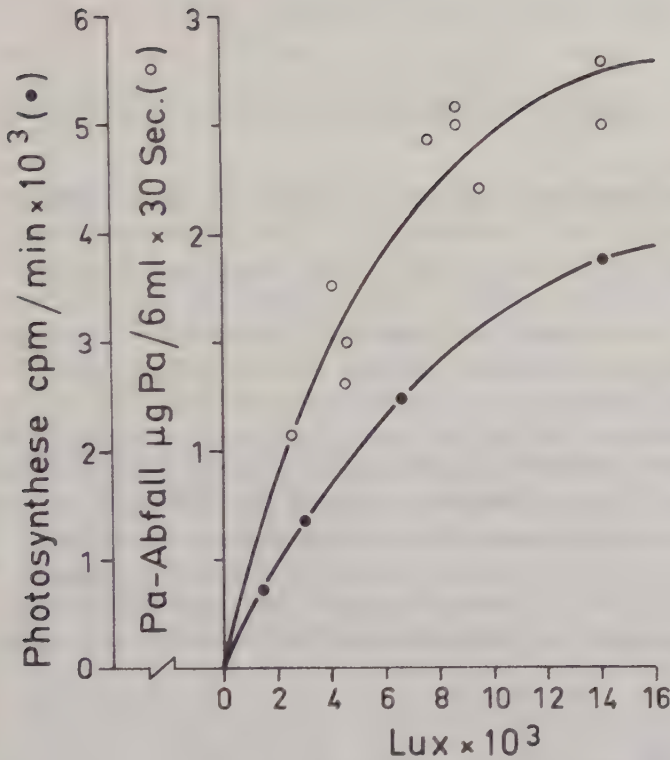


Abb. 16: Vergleich der Lichtintensitätsabhängigkeit von Photosynthese und aerobem Pa-Abfall

des anaeroben Pa-Abfalls bleibt. Nach 2 bis 3 Minuten ist das konstante Niveau im Licht erreicht. Bereits aus diesem Versuch wird deutlich, daß keine Pa-Umsatzrate ermittelt werden kann, die den nach Calvin geforderten $540 \mu\text{M ATP/mg Chl./h}$ entspricht. Im Gegensatz hierzu hatte sich aus dem anaeroben Pa-Abfall und aus der Glucoseassimilation derselbe Pa-Verbrauch errechnen und so die mögliche gemeinsame Ursache bei-

der Prozesse quantitativ bestätigen lassen.

3.2. Lichtintensitätsabhängigkeit des aeroben Pa-Abfalls

Die Entscheidung, ob auch der aerobe Pa-Abfall nur von Lichtreaktion I betrieben wird, oder ob er der nicht-cyclischen Photophosphorylierung zugeordnet werden muß, kann erst nach Prüfung seiner Reaktionen auf verschiedene äußere Einflüsse erfolgen. Versuche zur Lichtintensitätsabhängigkeit sollten dazu beitragen (Abb. 16). Genaue Messungen der Anfangsgeschwindigkeit des Pa-Abfalls unter Luft werden durch das niedere Dunkelniveau und die geringe Gesamtabnahme erschwert. Hieraus erklären sich die Schwankungen der für die einzelnen Intensitäten angegebenen Werte. Trotzdem ist ersichtlich, daß der aerobe Pa-Abfall eine der Photosynthese sehr ähnliche Intensitätsabhängigkeit aufweist und die unter N_2 erzielte Sättigung bei 2000 Lux weit überschreitet.

3.3. Der aerobe Pa-Abfall bei 715 nm

Da sich der aerobe Pa-Abfall in seiner Lichtsättigung weit mehr der Photosynthese nähert als dem anaeroben Pa-Abfall, wurde für die Verwendung von langwelligem Rotlicht nur eine geringe Veränderung des Pa-Spiegels erwartet (Abb. 17). In zwei Experimenten konnte bis 3 Minuten nach Lichtgabe keine Abnahme festgestellt werden, im Gegensatz zu den Versuchen unter N_2 , bei denen unter Verwendung der gleichen Rotlichtintensität dieselbe Abnahme wie im kurzwelligen Rotbereich erzielt wurde. Da auch die Photosynthese bei $\lambda = 715 \text{ nm}$ eine erhebliche Zunahme des Quantenbedarfs aufweist,

kann im Ausbleiben einer meßbaren Pa-Veränderung unter Dunkelrotbeleuchtung eine Bestätigung dafür gesehen werden, daß unter Luft nur die Funktion beider Pigmentsysteme zu einem Pa-Abfall führt.

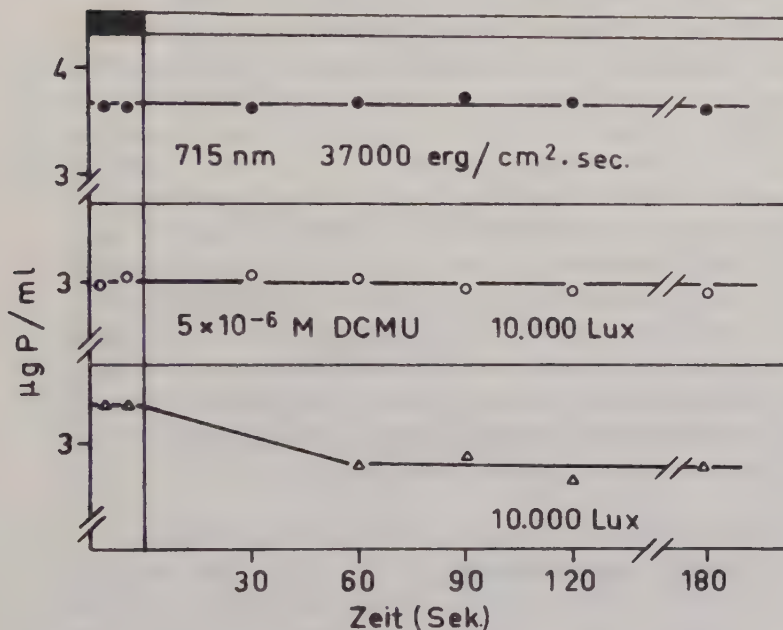


Abb. 17: Das Verhalten des aeroben Pa-Abfalls im Dunkelrotbereich und in Gegenwart von $5 \times 10^{-6} \text{ M DCMU}$

3.4. Der aerobe Pa-Abfall in Gegenwart von $5 \times 10^{-6} \text{M}$ DCMU

Wie auf Seite 54 ausgeführt, hemmt die Konzentration von $5 \times 10^{-6} \text{M}$ DCMU die photosynthetische O_2 -Entwicklung an Chlorella nahezu völlig, während der anaerobe Pa-Abfall nur auf etwa 50% der ungehemmten Geschwindigkeit verringert wird. Demnach ist auch durch die Verwendung von DCMU eine Möglichkeit gegeben, den aeroben Pa-Abfall einer der beiden Lichtreaktionen zuzuordnen. Aus dem Kurvenverlauf der Abb. 17 kann keine Veränderung des Pa-Spiegels beim Einschalten von Licht in Gegenwart von $5 \times 10^{-6} \text{M}$ DCMU beobachtet werden. Da sowohl die Photosynthese als auch der aerobe Pa-Abfall von derselben Konzentration unterbunden werden, darf man auf einen direkten Zusammenhang beider Reaktionen schließen, wie dies bereits durch Verwendung von langwelligem Rotlicht und die Messung der Lichtsättigung im Weißlicht möglich war.

3.5. Der aerobe Pa-Abfall im Dunkel-Licht-Wechsel nach Glucosefütterung

Auch durch Zugabe von Glucose zu verdunkelten Algen läßt sich ein Pa-Abfall herbeiführen, der, wie eine gleichzeitige Steigerung der O_2 -Aufnahme beweist, durch eine verstärkte Atmungstätigkeit der Zellen erklärt werden kann (Kandler 1950). Wie an Hefe (Freytag 1958) und an Chlorella (Kandler und Haber-Liesenköttner 1963) dokumentiert wurde, nehmen die Zuckerphosphate der Zellen hierbei mit Ausnahme des RuDP zu. Bei Belichtung der Algen werden diese Pools gemeinsam mit dem RuDP-Pool aufgefüllt (Calvin et al. 1952). Diese Beobachtung legt den Schluß

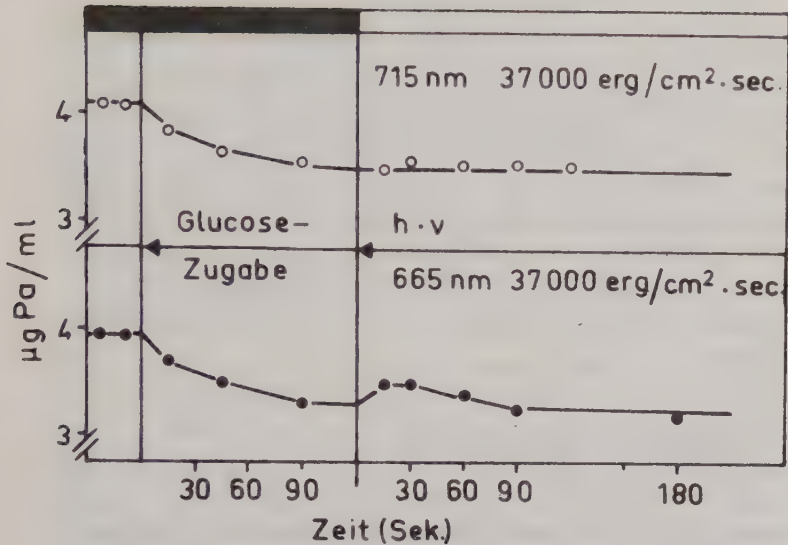


Abb. 18: Pa-Spiegelschwankungen im Dunkel-Licht-Wechsel bei 715 nm und 665 nm nach Glucosefütterung

nahe, daß der aerobe Pa-Abfall im Licht die Entstehung der photosynthetischen Zuckerphosphate widerspiegelt. Um diese Überlegung zu prüfen, wurden Algen, deren Glucoseaufnahmesystem bereits induziert war, im Dunkeln mit Luft begast und nach 15 Minuten mit Glucose versehen. (Abb. 18) Der Pa-Gehalt der Zellen nahm erwartungsgemäß ab und erreichte nach 90 Sekunden ein konstantes Niveau. Der Übergang zu Licht der Wellenlänge 715 nm mit der Intensität von $37000 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ erbrachte keine zusätzliche Änderung des Pa-Niveaus. Die geringe Photosyntheseleistung der Zellen unter diesen Bedingungen kann offensichtlich mit den durch die Glucoseassimilation erhöhten Zuckerphosphatpools durchgeführt werden. Bei Einstrahlung der Wellen-

länge 665 nm ergibt sich eine kurzzeitige Erhöhung des Pa-Niveaus, die jedoch schnell ausgeglichen wird. Das Pa-Niveau, das nun bei einer im Vergleich zu 715 nm achtfach höheren Photosyntheserate eingenommen wird, entspricht ebenfalls dem, das alleine durch Glucosezugebe im Dunkeln erreicht wurde. Die geringe Geschwindigkeit der Pa-Abnahme im Dunkel-Licht-Wechsel unter Luft und das Ausbleiben von Veränderungen des Pa-Spiegels in Glucosegegenwart nach Einschalten der Beleuchtung erhärten die Theorie, daß der aerobe Pa-Abfall die Auffüllung der photosynthetischen Zuckerphosphatpools anzeigt.

3.6. Diskussion der Ergebnisse

Photosynthese und aerober Pa-Abfall stimmen in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Parametern überein. Urbach et al. (1970) erzielten ähnliche Ergebnisse. Sie fanden eine identische Lichtsättigungskurve für die CO_2 -Fixierung und den ^{32}P -Einbau unter Luft + CO_2 an *Ankistrodesmus*. Da jedoch weder die ^{32}P -Einlagerung (Ullrich et al. 1969) noch die Zunahme des ATP-Gehaltes nach einem Dunkel-Licht-Wechsel in ganzen Blättern (Santarius et al. 1965) $10 \mu\text{M}/\text{mg Chl.}/\text{h}$ überschreiten, und aus dem aeroben Pa-Abfall ebenfalls nur ein Umsatz von $10 \mu\text{M PO}_4^{3-}/\text{mg Chl.}/\text{h}$ bei Lichtsättigung zu erreichen ist, d.h., nur maximal 2% des nach Calvin geforderten Umsatzes in vivo erfaßt werden, ist die Frage zu erörtern, ob aus diesen Versuchen ein klarer Beweis für die Existenz der nichtcyclischen Photophosphorylierung in vivo hervorgeht. Nimmt man an, daß die in vitro eindeutig bewiesene nichtcyclische Photophosphorylierung auch in vivo abläuft, so kann sie als Ursache für den Pa-Abfall angesehen werden. Bei der Einstrahlung von Licht

bilden nach Calvin und Arnon beide Photophosphorylierungen ATP, das in der photosynthetischen Induktionsphase sowohl zum Aufbau der Zwischenstoffpools des Calvinzyklus und der angeschlossenen Synthesewege als auch zur Reduktion der bereits im Dunkeln vorhandenen wie auch in steigendem Maße im Licht nachgelieferten Phosphoglycerinsäure dient. Wie aus der sofort einsetzenden Abnahme des Phosphoglycerinsäure-Spiegels beim Dunkel-Licht-Wechsel hervorgeht, wird die Dephosphorylierung gleichzeitig mit der ATP-Bildung in Gang gebracht (Kandler und Haberer-Liesenköttner 1963; Strotmann et al. 1969). Dieses synchrone Verhalten übt keinen Einfluß auf den Pa-Spiegel der Zellen aus. Nur die Festlegung des Pa über ATP in den Zwischenstoffen führt zu einer meßbaren Abnahme des Gesamtgehaltes von endogenem frei verfügbarem Phosphat. Nach zwei bis drei Minuten im Licht ist der Pa-Abfall und damit die Poolauffüllung beendet, das neue Fließgleichgewicht zwischen ATP-Bildung und -verbrauch hat sich eingestellt. Beide Reaktionen, die anfängliche Poolvergrößerung und die Reduktion der Phosphoglycerinsäure werden bei 715 nm in ihrer Geschwindigkeit reduziert und durch niedrigere DCMU-Konzentrationen unterbunden.

Ein klarer Beweis für die Existenz der nichtcyclischen Photophosphorylierung in vivo geht aus den gezeigten Daten nicht hervor. Zweifellos muß das Pa über die Stufe einer energiereichen Bindung in die Zwischenstoffe eingebaut werden. Diese nur zu Beginn der Photosynthese stattfindende Pa-Festlegung bei der Poolauffüllung könnte aber auch von der cyclischen Photophosphorylierung alleine betrieben werden, da sie mit einer Leistung von 40 $\mu\text{M P/mg Chl.}/\text{h}$ erheblich über der Geschwindigkeit des aeroben Pa-Einbaues liegt. Die Existenz der cyclischen Photophosphorylierung in vivo unter Aerobiose kann sowohl aus der frühen Lichtsät-

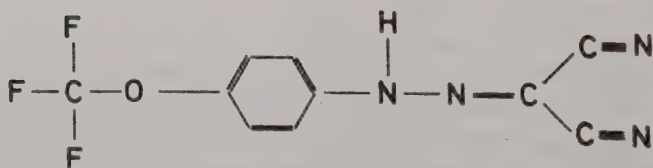
tigung des ^{32}P -Einbaues in die organische P-Fraktion unter Luft ohne CO_2 (Urbach et al. 1970) und aus den Versuchen zur Acetat-Aufnahme an Chlamydomonas, die Spuren O_2 benötigt, (Wiessner 1965) geschlossen werden. Eine späte Sättigung des aeroben α -Abfalls steht hierzu nicht im Gegensatz, da eine Sättigung bei niederen Lichtintensitäten durch die Festlegung des Pa in den Zwischenstoffen, deren Bereitstellung sich nach dem Grad der Photosynthese richtet, verschleiert wird. Schließlich könnte auch eine pseudocyclische Photophosphorylierung, die nach Heber (1969) in Spinat bei Anwesenheit von O_2 unter niederen Lichtintensitäten die cyclische Photophosphorylierung unterdrückt, für die anfängliche Poolsauffüllung verantwortlich sein, sofern sie in Algen abläuft. Versuche an Chloroplasten erbrachten einen identischen Kurvenverlauf für die nichtcyclische und die pseudocyclische Photophosphorylierung bezüglich der Lichtsättigung und des Verhaltens gegenüber langwelligem Rotlicht und Hemmstoffen wie o-Phenanthrolin und DCMU (Arnon et al. 1967). Zudem ist zu berücksichtigen, daß die Zellen unter O_2 in der Atmung ein ATP-bildendes System besitzen, das in seiner Leistung der cyclischen Phosphorylierung entspricht. Eine kurzzeitige Einbeziehung dieser Energiequelle zur anfänglichen Auffüllung der Zwischenstoffe wäre denkbar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Zuordnung des aeroben Pa -Abfalls zu einer bestimmten Photophosphorylierung nicht eindeutig möglich ist, obwohl er in seinen Reaktionen der nichtcyclischen Photophosphorylierung in vitro gleicht. Dies gilt auch für den von Urbach und Mitarbeitern als Test auf diese Phosphorylierung angewandten ^{32}P -Einbau unter Luft + CO_2 oder N_2 + CO_2 . Dieses Meßverfahren bewirkt, wie aus den gut übereinstimmenden Ergebnissen zum Pa -Abfall hervorgeht, offensichtlich nur eine Markierung

des Phosphat-Pools, der in die Pa-Spiegelschwankungen einbezogen wird. Ein speziell der nichtcyclischen Photophosphorylierung zugehöriger Phosphat-Pool mit hoher Durchsatzgeschwindigkeit ist bisher mit keiner Meßmethode mit Sicherheit erfaßt worden.

Teil B: Einwirkung von FCCP und Salicylaldoxim auf
den Pa-Abfall und die Photosynthese

Verschiedene Verbindungen aus der Gruppe der Carbonylcyanidphenylhydrazone gelten als wirkungsvolle Entkopp-
ler der oxidativen (Heytler u. Prichard, 1962; Lardy
u. Ferguson, 1969; Weinbach u. Garbus, 1969) wie auch
der Photophosphorylierung (Avron u. Shavit, 1963, 1965;
Bamberger et al. 1963; Gross u. San Pietro, 1969).
Plengvidhya u. Burris (1965) konnten zeigen, daß eine
Konzentration von $7,2 \times 10^{-6} \text{M}$ CCCP in ganzen Spinat-
chloroplasten die Photophosphorylierung völlig unter-
bindet, die gleichzeitige Photoreduktion von DCPIP je-
doch nicht beeinflußt. Eine 50%-ige Hemmung dieser
Reaktion wurde erst bei der hohen Konzentration von
 $3 \times 10^{-5} \text{M}$ erreicht. Bamberger et al. (1963) erzielten
eine völlige Blockierung der an die NADP-Reduktion
gebundenen und mit H_2O als Donor ablaufenden Phos-
phorylierung bereits bei $1 \times 10^{-6} \text{M}$ CCCP, wobei die Re-
duktion von NADP selbst bei $1 \times 10^{-5} \text{M}$ nur um 10% ver-
mindert war. De Kiewiet et al. (1965) untersuchten
die Wirkung von CCCP auf drei nichtcyclische (H_2O -
Ferricyanid; H_2O - NADP; Ascorbat - NADP) und drei
cyclische (Cofaktoren: PMS, K_3 , FMN) Systeme. Hier-



Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon

bei erwiesen sich alle nichtcyclischen Systeme wesentlich empfindlicher gegenüber dem Entkoppler als die Meßverfahren der cyclischen Photophosphorylierung. Zum gleichen Ergebnis kamen schon Avron und Shavit (1963) beim Vergleich der mit einer Ferricyanid-Reduktion gekoppelten Phosphorylierung und der PMS-gebundenen cyclischen ATP-Bildung. Bei diesen in vitro-Experimenten ist jedoch die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die beobachteten Unterschiede in der Empfindlichkeit beider Phosphorylierungen auf die großen Differenzen im Redoxzustand der Meßsysteme zurückzuführen sind (Good et al. 1966). Dilley und Vernon (1964) sowie Izawa (1965) ermittelten den Einfluß von CCCP und FCCP auf lichtbedingte Konformationsänderungen an Chloroplasten. Sie fanden im Gegensatz zu den Entkopplern Methyamin und Atebrin, die Konformationsänderungen erlauben, keine Veränderung der Lichtstreuung bei Gegenwart von CCCP sowie FCCP und setzten demnach die Hemmstelle direkt am hochenergetischen Zwischenprodukt der ATP-Bildung fest.

Die geringe Empfindlichkeit cyclischer Systeme in Chloroplastenpräparationen konnte an ganzen Zellen nicht bestätigt werden. Tanner et al. (1969) zeigten eine völlige Hemmung der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation bei $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP in Chlorella. Die 50%-ige Hemmung war bei $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ im Weißlicht und ebenso bei Verwendung einer Dunkelrotbeleuchtung mit $\lambda = 715 \text{ nm}$ erreicht (Klob, unveröffentlichte Resultate). Auch die zur Photosynthese unfähige Scenedesmus-Mutante Nr. 11 weist eine 50%-ige Hemmung der Glucoseaufnahme durch FCCP bei $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ auf (Hirt, unveröffentlichte Resultate). Die Photosynthese an Chlorella war bei einer Konzentration von $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ des Entkopplers noch nahezu unbeeinflusst. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren auf eine nicht stöchiometrische Beteiligung der cyclischen

Photophosphorylierung an der Photosynthese.

In der Untersuchung des Einflusses von FCCP auf die lichtinduzierte, endogene Pa-Abnahme wurde eine gute Möglichkeit gesehen, diese Erkenntnis unter Ausschaltung von Transportphänomenen, wie sie bei der Glucose-assimilation gegeben sind, experimentell zu überprüfen.

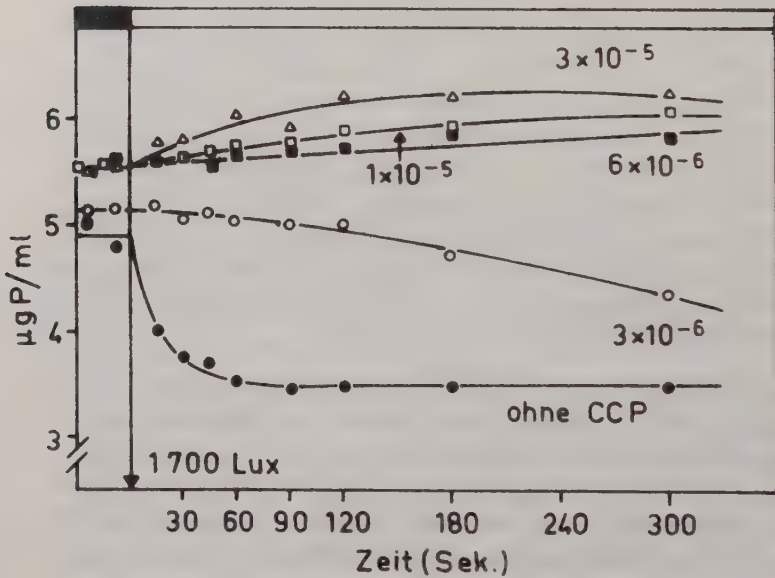


Abb. 19: Einfluß verschiedener FCCP-Konzentrationen auf den anaeroben Pa-Abfall

1. Der Einfluß von FCCP auf den anaeroben Pa-Abfall
und die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung

Abb. 19 veranschaulicht das Verhalten des anaeroben Pa-Abfalls nach einem Dunkel-Licht-Wechsel in Chlorella-Zellen gegenüber verschiedenen Konzentrationen von FCCP. Während der Pa-Gehalt im Kontrollexperiment ohne Entkopplerzusatz bei Einstrahlung von 1700 Lux Weißlicht sofort abnimmt und nach etwa 1 Minute ein konstantes Niveau erreicht, ist die Verminderung des endogenen Pa-Spiegels bereits bei einer Hemmstoffkonzentration von $3 \times 10^{-6} \text{M}$ erheblich reduziert. In der ersten Minute nach Lichtgabe tritt keine Änderung auf. Erst im weiteren Verlauf des Versuches wird eine Abnahme des PO_4^{3-} und damit eine Tätigkeit der mit äußerst geringem Umsatz ablaufenden cyclischen Photophosphorylierung erkennbar. Die Zugabe von Konzentrationen

» $6 \times 10^{-6} \text{M}$ FCCP unterbindet während der gesamten Versuchsdauer von 5 Minuten jegliche Pa-Spiegel-Erniedrigung. Es muß angenommen werden, daß hierbei das Anlaufen der cyclischen Photophosphorylierung unterbleibt.

Die Messung der Photosynthese wurde zum direkten Vergleich in der für die Ermittlung des Pa-Abfalls verwendeten Apparatur durchgeführt. Nach dem Einbringen der Algen erfolgte eine 15-minütige kräftige N_2 -Begasung. Während dieser Zeit wurde bereits Licht der Intensität 1700 Lux eingestrahlt. Als Start der Photosynthesemessung galt der Zeitpunkt der NaHCO_3 -Zugabe. Wie in Abb. 20 wiedergegeben, läßt die Konzentration von $6 \times 10^{-6} \text{M}$ FCCP, die den anaeroben Pa-Abfall völlig unterband, keine Beeinträchtigung des steady-state-Photosynthese sowie deren Induktion nach Vorbelichtung erkennen. Hiermit finden die von Tanner et al. (1969) durch Vergleich der anaeroben Glucoseassimilation

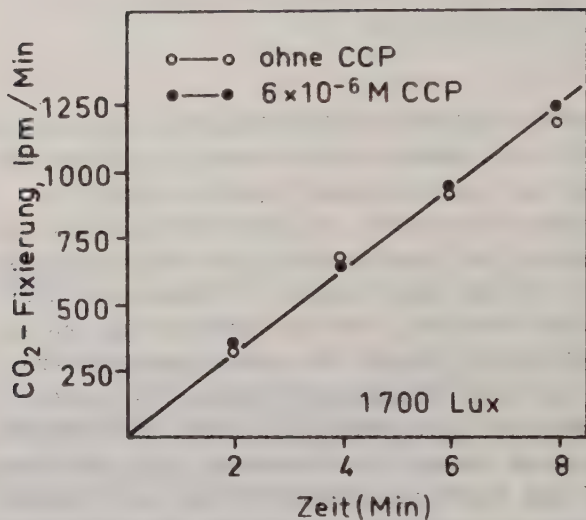


Abb. 20: Einfluß von 6×10^{-6} M FCCP auf die Photosyntheseinduktion nach Vorbelichtung

und der Photosynthese unter FCCP-Einfluß erzielten Ergebnisse ihre volle Bestätigung. Die cyclische Photophosphorylierung in vivo erweist sich als wesentlich empfindlicher gegenüber dem Zusatz von FCCP als die durch $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung erfaßte Photosynthese.

Da die Photosynthese nach Vorbelichtung gemessen worden war, konnte mit diesen Versuchen nicht entschieden werden, ob die Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung nach einem Dunkel-Licht-Wechsel Einfluß auf die Induktionsphase der CO_2 -Fixierung nimmt. Es war deshalb notwendig, die Photosyntheseinduktion unter Bedingungen zu untersuchen, die auch für die Beobachtungen von Pa-Spiegel-Schwankungen unter FCCP-

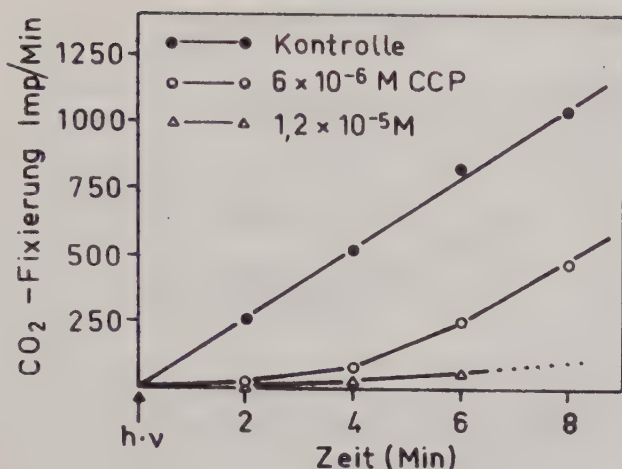


Abb. 21: Einfluß von FCCP auf die Photosynthese-Induktion nach Dunkel-Licht-Wechsel

Einfluß angewandt worden waren. Der Start der CO₂-Fixierung erfolgte diesmal durch einen Dunkel-Licht-Wechsel. Das radioaktive NaHCO₃ wurde schon während der Dunkelperiode zugegeben. In Abb. 21 zeigt der Kontrollversuch ohne Zusatz des Entkopplers einen linearen Anstieg der CO₂-Assimilation. Wird der Dunkel-Licht-Wechsel in Gegenwart von 6x10⁻⁶M FCCP durchgeführt, so ist die Photosynthese während der ersten 4 bis 5 Minuten nach Belichtung stark gehemmt. Etwa 6 Minuten nach Versuchsbeginn erreicht sie jedoch einen der Kontrollrate entsprechenden ¹⁴CO₂-Einbau. Somit weist die Photosynthese in Anwesenheit einer Entkopplerkonzentration, die keine Wirkung auf die steady-state-CO₂-Fixierung erkennen läßt (Abb. 20), eine Lag-Phase nach Einschalten der Beleuchtung auf, die wahrscheinlich auf einen Mangel an cyclisch ge-

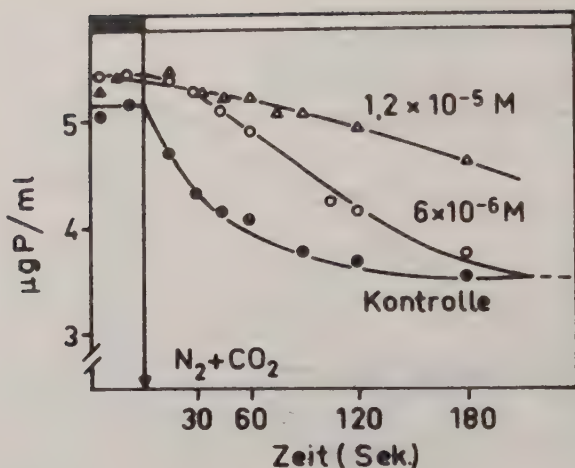


Abb. 22: Einfluß von FCCP auf den Phosphat-Abfall bei Begasung mit N_2+CO_2

bildetem ATP zurückzuführen ist.

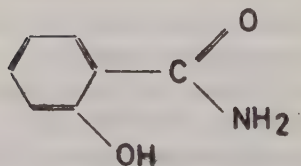
Die Pa-Spiegel-Schwankungen in Gegenwart von FCCP waren stets unter reiner N_2 -Begasung gemessen worden, unter Bedingungen, die den alleinigen Ablauf der cyclischen Photophosphorylierung bewirken. Es war demnach von Interesse, das Verhalten des endogenen Pa-Gehaltes während der Photosyntheseinduktion, also in Gegenwart von $NaHCO_3$ im Medium zu untersuchen (Abb. 22). Hatte eine Entkopplerkonzentration von $6 \times 10^{-6} M$ jegliche Veränderung des Pa-Spiegels unter N_2 verhindert, so konnte nun bei Anwesenheit von Bicarbonat eine langsame Abnahme des endogenen PO_4^{3-} beobachtet werden. Nach drei bis vier Minuten war das Lichtniveau der Kontrolle erreicht. Auch eine Verdoppelung der FCCP-Konzentration führte nicht zur völligen Verhinderung der Pa-Abnahme.

Aus dem Vergleich der Versuche über den Pa-Abfall und die Photosyntheseinduktion läßt sich folgende Arbeits-hypothese ableiten:

In der ungehemmten Kontrolle beginnt die cyclische Photophosphorylierung unmittelbar nach Belichtung mit der Bildung von ATP, das zum Aufbau der für die Photosynthese notwendigen Zwischenstoff-Pools verwendet wird. Die photosynthetische CO_2 -Fixierung läuft ohne Verzögerung an. In Gegenwart von $6 \times 10^{-6} \text{M}$ FCCP wird die cyclische Photophosphorylierung, gemessen als anaerober Pa-Abfall, völlig unterbunden, die steady-state-Photosynthese jedoch noch beeinflusst. Die Induktion der Photosynthese aber zeigt nach einem Dunkel-Licht-Wechsel bei derselben Giftkonzentration eine kurzzeitige Lag-Phase, während der das endogene PO_4^{3-} in Gegenwart von Bicarbonat langsam auf das Pa-Niveau der ungehemmten Kontrolle absinkt. Erst nach Erreichen dieses Niveaus läuft die Photosynthese trotz Anwesenheit des Entkopplers mit ungehinderter Rate. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vermutet, daß ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Auffüllung phosphorylierter Zwischenstoff-Pools und der Photosyntheserate besteht. Eine durch Mangel an cyclisch gebildetem ATP hervorgerufene niedere Poolauffüllung wäre demnach als Ursache der Lag anzusehen. Zur Prüfung dieser Arbeitshypothese wurde im Teil C der vorliegenden Arbeit das Verhalten von RuDP unter FCCP-Einfluß im Dunkel-Licht-Wechsel untersucht, da der unmittelbare CO_2 -Akzeptor die Poolauffüllung direkt widerspiegeln sollte.

2. Die Wirkung von Salicylaldoxim auf den anaeroben Pa-Abfall und die Photosynthese

Nach Green et al. (1939) verringert Salicylaldoxim, ein Cu-Komplexbildner, Atmung und Photosynthese in Chlorella. Die Hill-Reaktion in Spinatchloroplasten mit H_2O als Elektronendonator und NADP als Akzeptor wird von $10^{-2}M$ Salicylaldoxim gehemmt, nicht jedoch, wenn H_2O in seiner Donoreigenschaft durch DCPIP/Ascorbat ersetzt wird (Trebst 1963). Das Ausbleiben der lichtabhängigen Absorptionsänderung bei 591 nm in Ulva lobata bei Gegenwart des Hemmstoffs (Fork u. Urbach, 1965) verweist ebenso wie das Ergebnis von Trebst auf eine Blockierung des Elektronentransportes am Plastocyanin.



Salicylaldoxim

Katch u. San Pietro (1966) fanden jedoch für die Konzentration von $10^{-2}M$ Salicylaldoxim an ganzen und beschallten Chloroplasten jeweils eine 100%-ige Hemmung der Hill-Reaktion mit DCPIP. Da durch Ultraschallbehandlung Plastocyanin aus der Elektronentransportkette herausgelöst wird, sollte der Hemmstoff an einer anderen Stelle eingreifen. Renger et al. (1967) zeigten, daß nicht Plastocyanin, sondern die Lichtreaktion II oder eine in ihrer Nähe eingreifende Redoxsubstanz als Hemmstelle angesehen werden muß.

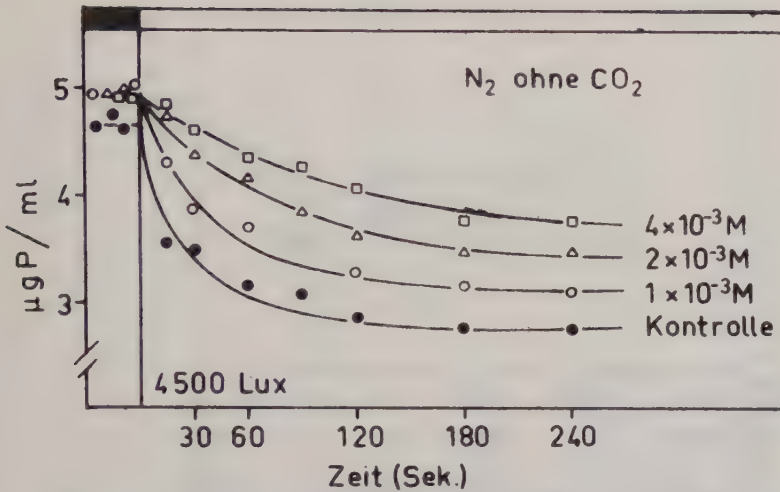


Abb. 23: Einfluß von Salicylaldoxim auf den anaeroben Pa-Abfall

Eine ausführliche Untersuchung über die Wirkung von Salicylaldoxim auf ganze Zellen wurde von Tanner et al. (1969) durchgeführt. Die cyclische Photophosphorylierung, gemessen als anaerobe, lichtabhängige Glucoseassimilation, erwies sich als wesentlich empfindlicher gegenüber diesem Gift als die mittels C_2 -Entwicklung erfaßte Photosynthese. Erstere war an *Chlorella* bei $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ bereits völlig unterbunden. Die vollständige Blockierung der Photosynthese gelang erst mit der hohen Konzentration von $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ Salicylaldoxim. Die Konzentrationsabhängigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung an *Ankistrodesmus* (Urbach u. Gimmler, 1969) gleicht der an *Chlorella*. Der Einbau von ^{32}P in die organische Phosphatfraktion als Maß der cyclischen Photophosphorylierung erreichte bei $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ Salicylaldoxim nur noch etwa 10 % der un-

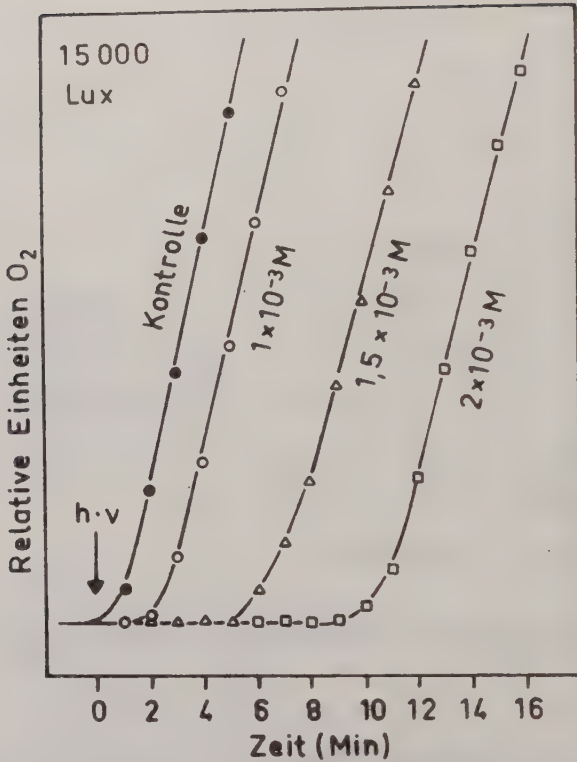


Abb. 24: Wirkung von Salicylaldoxim auf die Photosynthese

gehemmte Kontrolle. Da beide Arbeitsgruppen aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Photophosphorylierungen auf eine nicht stöchiometrische Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der Photosynthese schließen, wurde dieser Hemmstoff auch auf den anaeroben Pa-Abfall und die Photosynthese angewandt. Bei einer Konzentration von $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ Salicylaldoxim wird die Pa-Abnahme deutlich vermindert (Abb. 23), während die O₂-Entwicklung keine Verän-

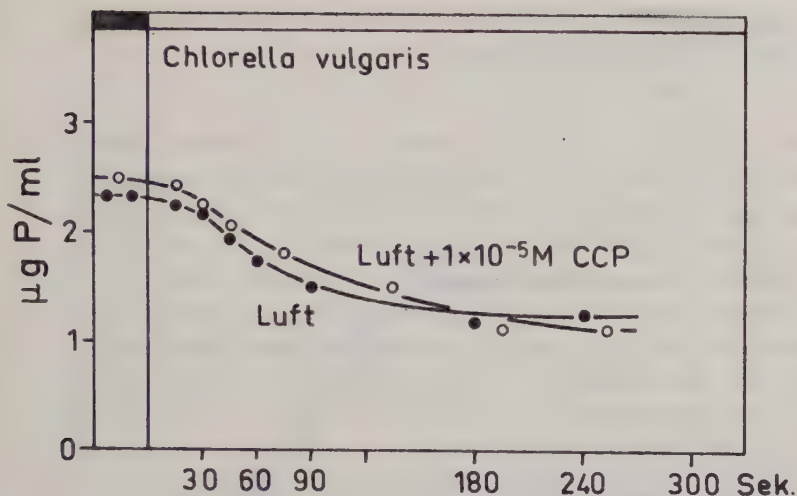


Abb. 25: Einfluß von 1×10^{-5} M FCCP auf den aeroben Pa-Abfall

derung der steady-state-Photosynthese erkennen läßt (Abb. 24). Aus den mit Daten von Tanner oder Urbach gut übereinstimmenden Ergebnissen läßt sich erneut, wie schon in Teil A der vorliegenden Arbeit ein enger Zusammenhang zwischen Pa-Abfall, Glucoseassimilation und 32 P-Einbau unter N_2 ableiten. Der auch bei diesen Untersuchungen aufgetretene Empfindlichkeitsunterschied zwischen Pa-Abnahme und O_2 -Entwicklung verweist auf die nicht stöchiometrische Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der Photosynthese. Auch Salicylaldoxim bewirkt, wie bereits für FCCP beschrieben eine Lag-Phase der Photosynthese, wenn der Dunkel-Licht-Wechsel unter N_2 ausgeführt wird. Damit erscheint bewiesen, daß eine solche Verzögerung der vollen Photosyntheseleistung keinen speziell durch den Entkoppler FCCP hervorgerufenen Effekt darstellt.

3. Der Einfluß von FCCP auf die Photosyntheseinduktion unter aeroben Bedingungen

Eine durch FCCP bedingte Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung hatte unter N_2 -Begasung zur Verzögerung der Induktion der Photosynthese nach einem Dunkel-Licht-Wechsel geführt. Wenn insbesondere ATP der cyclischen Photophosphorylierung zu Beginn der Photosynthese von Bedeutung sein soll, müßte die unter N_2 beobachtete Lag-Phase der CO_2 -Fixierung sowie die Verzögerung des Pa-Abfalls auch unter aeroben Bedingungen zu beobachten sein.

3.1. Der aerobe Pa-Abfall in Gegenwart von FCCP

In Abb. 25 ist ein Versuch über die Auswirkung von FCCP auf den aeroben Pa-Abfall dargestellt. Die experimentellen Bedingungen gleichen mit Ausnahme der Begasung denen unter N_2 . Entsprechend früherer Befunde ist das Pa-Niveau im Unterschied zur N_2 -Begasung erniedrigt und die Geschwindigkeit der Phosphatverminderung nach Belichtung gering. Wird 6 Minuten vor der Lichteinstrahlung FCCP mit einer Endkonzentration von $1 \times 10^{-5} M$ zugesetzt, so läßt sich keine Beeinträchtigung der Pa-Spiegel-Schwankung beobachten. Beide Kinetiken, die mit dem gleichen Algenmaterial erhalten wurden, zeigen einen identischen Kurvenverlauf und erreichen nach etwa 3 Minuten Versuchsdauer ein konstantes Niveau.

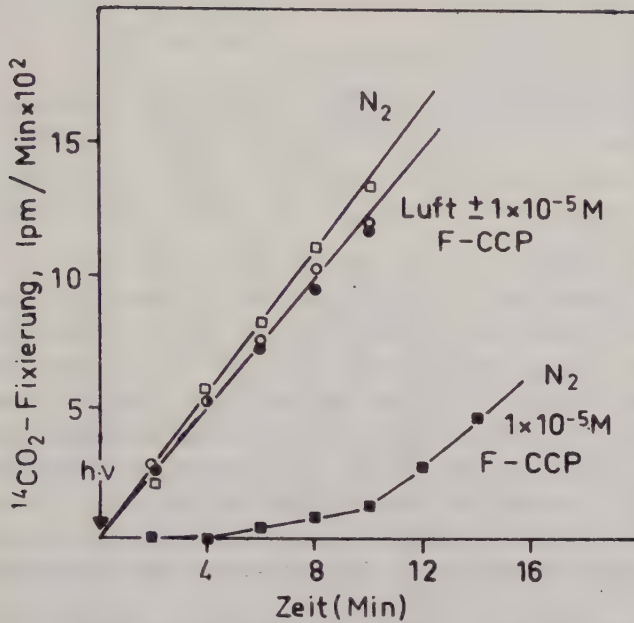


Abb. 26: Vergleich der Photosyntheseinduktion unter N_2 und Luft in Gegenwart von 1×10^{-5} M FCCP

3.2. Vergleich der Photosyntheseinduktion unter N_2 und Luft in Gegenwart von 1×10^{-5} M FCCP

Wie aus den obigen Ergebnissen geschlossen werden kann, verläuft die aerobe Auffüllung der Pools phosphorylierter Zwischenstoffe des Calvin-Cyclus in An- und Abwesenheit von 1×10^{-5} M FCCP gleich schnell. Demnach sollte unter Luftbegasung keine Verzögerung der Photosyntheseinduktion zu beobachten sein, vorausgesetzt, es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der CO_2 -Fixierungsrate und der Höhe der Pools phosphorylierter

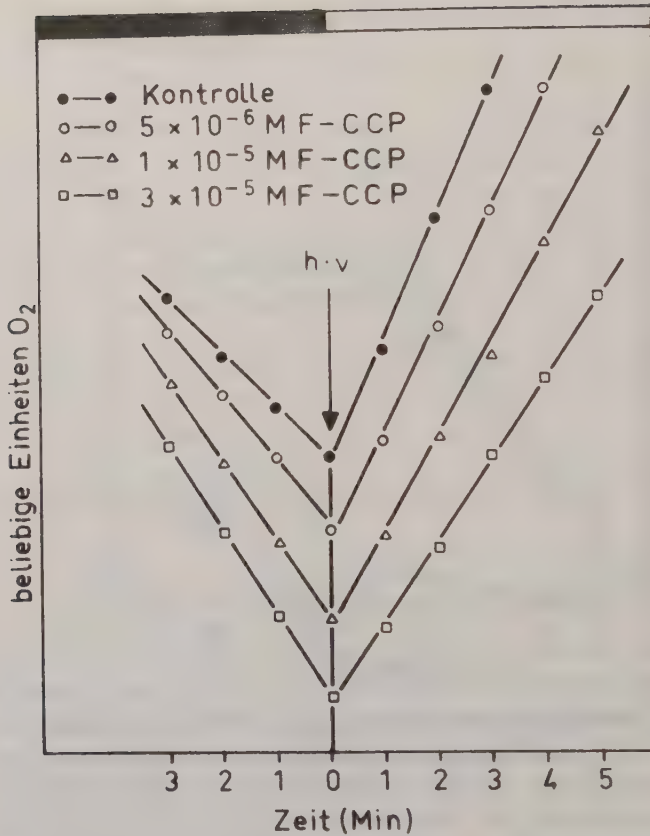


Abb. 27: Einfluß von FCCP auf die aerobe Photosyntheseinduktion

Zwischenstoffe. Um einen möglichst direkten Vergleich der aeroben und anaeroben Induktion zu erzielen, wurden beide Versuchsbedingungen mit Algen aus derselben Ernte überprüft (Abb. 26). Die $^{14}CO_2$ -Fixierung unter N_2 läuft ohne Zusatz von FCCP unmittelbar nach Einschalten von Licht mit ungehemmter Rate an. Die An-

wesenheit von $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP bereits während der letzten 6 Minuten vor Lichtgabe bewirkt die schon früher beschriebene Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung und verursacht eine 10 bis 12 Minuten andauernde Lag-Phase. Wurden die Algen jedoch bei gleicher Vorbehandlung mit Luft begast, so konnte sowohl im Kontrollansatz wie auch bei FCCP-behandelten Algen keine Verzögerung der Photosyntheseinduktion beobachtet werden.

Dieser Versuch beweist zudem, daß die verwendete Entkopplerkonzentration ohne wesentlichen Einfluß auf die steady-state-Photosynthese bleibt, wobei die Fixierungsrate unter Luft etwas niedriger liegt als unter N_2 . Das Ausbleiben der Lag-Phase in Luft bei einer Entkopplerkonzentration, die die cyclische Photophosphorylierung völlig unterbunden hatte, erlaubt den Schluß, daß in Luft eine andere Energiequelle als die cyclische ATP-Bildung am anfänglichen Aufbau photosynthetischer Zwischenstoffe beteiligt sein kann.

Bei früheren Untersuchungen mit CCP verfolgten Hommersand (1963) an *Chlorella pyrenoidosa* und Kaltwasser et al. (1969) an *Scenedesmus obliquus* den O_2 -Gaswechsel im Dunkel-Licht-Wechsel. Für einen möglichst direkten Vergleich mit diesen Arbeiten wurde auch mit dem vorliegenden Algenmaterial die Sauerstoff-Produktion unter verschiedenen FCCP-Konzentrationen gemessen (Abb. 27). Die fünfminütige Einwirkung des Entkopplers auf verdunkelte Chlorellen erbrachte bis zu $3 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP keine Verzögerung der Sauerstoffentwicklung nach Einschalten der Belichtung. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Befunden der oben beschriebenen aeroben $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in Gegenwart des Entkopplers. Die von Hommersand und Kaltwasser auch unter Luft berichtete Lag der Photosynthese konnte an *Chlorella vulgaris* nicht gezeigt werden. Mögliche Ursachen dieser Diskrepanz sollen im weiteren Verlauf

der vorliegenden Arbeit durch Messung der FCCP-Wirkung auf energieliefernde Prozesse während der Dunkelinkubation der Algen unter N_2 und O_2 untersucht werden.

3.3. Einwirkung steigender FCCP-Konzentrationen auf die steady-state-Photosynthese

Bisherige Untersuchungen beschränkten sich meist auf die Verwendung eines Konzentrationsbereiches $\leq 1 \times 10^{-5} M$ FCCP. Um die Wirkung des Entkopplers darüber hinaus zu verfolgen, wurden nun höhere Konzentrationen auf die

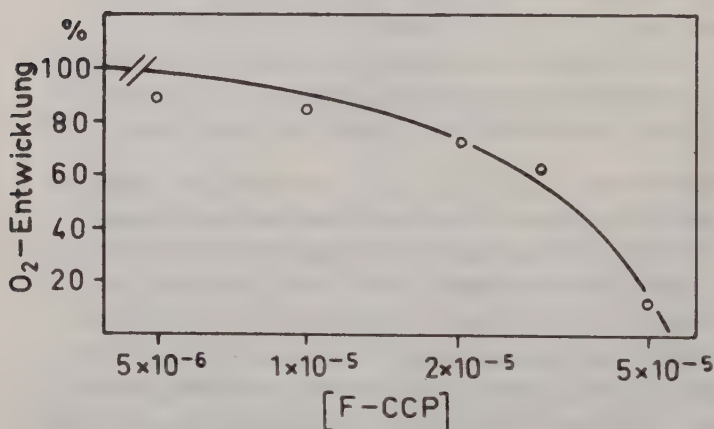


Abb. 28: FCCP-Konzentrationsabhängigkeit der photosynthetischen O_2 -Entwicklung

photosynthetische O_2 -Entwicklung angewandt (Abb. 28). Eine 25%-ige Hemmung war bei $2 \times 10^{-5} M$ FCCP erreicht. Konzentrationen $> 5 \times 10^{-5} M$ unterbinden die Photosynthese völlig. Da für die jeweilige Hemmung durch CCP

das Verhältnis:

Algenzahl / ml Suspension : Giftmenge / ml Suspension
von Bedeutung sein könnte, werden bei den Ergebnissen
anderer Autoren zum besseren Vergleich neben der Ent-
kopplerwirkung auch die verwendeten Algenkonzentra-
tionen angegeben. Tanner et al. (1969) berichten eben-
falls von einer nur geringfügigen Hemmung der Photo-
synthese an *Chlorella* (ca. 33,5 μ l p.c./ml) bei 3×10^{-5} M
CCCP. Sogar die hohe Konzentration von 1×10^{-4} M läßt die
Sauerstoff-Entwicklung an *Chlorella pyrenoidosa* (ohne
Angabe der verwendeten Algenmenge) unbeeinflusst (Hom-
mersand 1963). *Scenedesmus obliquus* (33 μ l p.c./ml)
entwickelt ab 5×10^{-5} M CCCP keinen O_2 (Kaltwasser et
al. 1969), während zur vollständigen Blockierung der
 $^{14}CO_2$ -Fixierung in *Ankistrodesmus braunii* (geschätz-
ter Wert ca. < 4 μ l p.c./ml) eine Konzentration von
 2×10^{-6} M CCCP genügt (Urbach u. Gimmler, 1969). Die
eigenen Befunde an *Chlorella* (28 μ l p.c./ml Suspension)
stehen mit denen von Tanner und Kaltwasser in gutem
Einklang. Die hohe Empfindlichkeit von *Ankistrodes-*
mus könnte sich durch die Verwendung einer 7 bis 8-
fach dünneren Algensuspension erklären lassen. Der
Zusatz von 1×10^{-5} M CCCP zu *Chara foetida* erbrachte
eine 25%-ige, die Zugabe der gleichen Konzentration
zu *Limnophila gratioloides* eine etwa 40%-ige Hemmung
der $^{14}CO_2$ -Fixierung (Penth u. Weigl, 1971).

3.4. Zeitabhängigkeit der FCCP-bedingten Photosyn- thesehemmung

Nach Penth u. Weigl (1971) wirkt sich CCCP erst nach
30 und mehr Minuten auf die Höhe des ATP-Pools sowie
den SO_4^{2-} -Influx an *Limnophila* aus. Da die Einwirkungs-
dauer des Entkopplers bei den Photosynthesemessungen
der vorliegenden Arbeit 6 Minuten nicht überschreitet,

erwies es sich als notwendig, eine Zeitabhängigkeit der FCCP-Wirkung auf die O_2 -Entwicklung zu erstellen. Hierzu wurden die Algen bei $1 \times 10^{-5} M$ FCCP im Wasserbad von $26^\circ C$ kräftig geschüttelt. Bei den in der Tabelle angegebenen Zeitabständen und einmal vor Zugabe des Entkopplers erfolgte die Bestimmung der O_2 -Produktion aliquoter Mengen dieser Algen im Oxygraphen.

Tabelle 4: Zeitabhängigkeit der FCCP-bedingten Photosynthesehemmung

		Zeit (Min.)				
Exp.	Kontrolle	0	20	40	60	120
I	50/100	45/90	43/86	41/82	47/94	41/82
II	55/100	45/82	40/73	48/87	45/82	45/82
Ø	100	86	79	84	88	82

Die erste Ziffer bezeichnet die jeweils gemessenen Einheiten O_2 , die zweite gibt die % der Kontrolle wieder. Temperatur = $26^\circ C$; pH = 6,5; Beleuchtung: 4000 Lux Weißlicht; Medium: 0,08 M Natrium-Phosphat-Puffer

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, ist an Chlorella auch nach zweistündiger Versuchsdauer keine Erhöhung der zwischen 12 und 21 % schwankenden Photosynthesehemmung zu erkennen. Die Wirkung des Entkopplers tritt vielmehr unmittelbar nach der Zugabe ein und bleibt von diesem Zeitpunkt an konstant. Das Ausbleiben der Lag-Phase bei der Photosyntheseinduktion kann demnach nicht auf eine zu kurze Enwirkungsdauer von FCCP zurückgeführt werden.

4. Untersuchungen zur Inaktivierung von FCCP durch Licht

Für die Aufhebung einer Lag-Phase sind zwei Erklärungen möglich:

1. Die cyclische Photophosphorylierung bleibt durch FCCP dauerhaft gehemmt. Eine Abnahme des Pa-Gehaltes nach dem Dunkel-Licht-Wechsel muß demnach von einer gegen den Hemmstoff unempfindlicheren Photophosphorylierung, eventuell der nichtcyclischen in Gegenwart von CO_2 bewirkt werden.
2. Das Anlaufen der cyclischen Photophosphorylierung wird nur um die Zeitspanne verzögert, die notwendig ist, um den Hemmstoff im Licht zu inaktivieren oder zu zerstören.

Bereits 1963 zeigte Heytler, daß der Zusatz von Cystein zu Mitochondrien und Chloroplasten die entkoppelnde Wirkung von CCP vermindert. Im UV-Spektrum wird das Absorptionsmaximum von CCCP bei 230 nm durch die Reaktion mit Cystein nach 250 nm verschoben (Penth u. Weigl, 1971). Die durch CCCP gesenkte Aufnahmegeschwindigkeit für SO_4^{2-} und Cl^- -Ionen sowie die verminderte CO_2 -Fixierung erreichen in Chara bei Gegenwart von 5×10^{-4} M Cystein die gleichen, wie in Versuchen ohne CCP erzielten Raten (Penth u. Weigl, 1971). Es wurde deshalb vermutet, daß Entkoppler und Aminosäure zu einer nicht mehr entkoppelnden Verbindung reagieren. Da nur belichtete Chloroplasten eine SO_4^{2-} -Reduktion ausführen, wobei das erste faßbare organische Produkt Cystein darstellt (Schmidt 1968), liegt der Gedanke nahe, daß während der Verdunkelung in Chloroplasten eingedrungenes CCP bei anschließender Lichtgabe durch das entstehende Cystein zunehmend gebunden und in inaktivem Zustand gehalten wird. Für die

Richtigkeit dieser Theorie liegen jedoch weder Be-
weise aus in vitro noch aus in vivo-Experimenten vor.
Die exogene Zugabe von Cystein führt, wie aus der Ver-
änderung des UV-Spektrums ersichtlich, auch ohne An-
wesenheit von Chloroplasten zu einer chemischen Ver-
änderung von FCCP und damit praktisch zu einer Ernied-
rigung der Entkopplerkonzentration im Versuchsansatz.
Gegen eine Inaktivierung oder Zerstörung von CCP durch
Licht läßt sich ein Literatur-Beweis anführen.

Tanner et al. (1969) fanden, daß Glucose bei 10000 Lux
Weißlicht und $1,5 \times 10^{-5}$ M FCCP mit der gleichen Rate
aufgenommen wird wie in der nicht mit Gift behandelten
Kontrolle. Wird das Experiment bei 2000 Lux unter Vor-
schaltung einer Beleuchtungsperiode mit 10000 Lux durch-
geführt, so ist die Aufnahme um etwa 50 % erniedrigt.
Bei einer durch hohe Intensitäten bedingten Inaktivie-
rung wäre auch in der folgenden Schwachlichtperiode
die volle Assimilationsleistung zu erwarten gewesen.

Eigene Untersuchungen zur lichtbedingten Inaktivierung
von FCCP wurden mit den anaeroben Pa-Schwankungen
durchgeführt (Abb. 29). Die Kurve I beweist, daß der
Abfall des anorganischen Phosphats nach einem Dunkel-
Licht-Wechsel bei der Lichtintensität von 1500 Lux
in demselben Algenansatz wiederholbar ist, wenn eine
zur Erhöhung des Pa-Niveaus ausreichende Dunkelperiode
zwischengeschaltet wird. 1×10^{-5} M FCCP im Ansatz unter-
bindet trotz Vorbelichtung eine Pa-Abnahme in der zwei-
ten Lichtperiode (Kurve II). Dieses Ergebnis stimmt
überein mit den Befunden von Tanner et al. (1969) an
der Glucoseassimilation. Beginnt man bereits vor der
ersten Lichtperiode mit der Probenentnahme (Kurve III),
so kann in der zweiten Lichtperiode eine geringe Ab-
nahme des endogenen Pa-Spiegels verfolgt werden. Da
die einzige Variable, verglichen mit Kurve II, in der
vermehrten Abnahme der Algen-Schichtdicke gefunden wur-

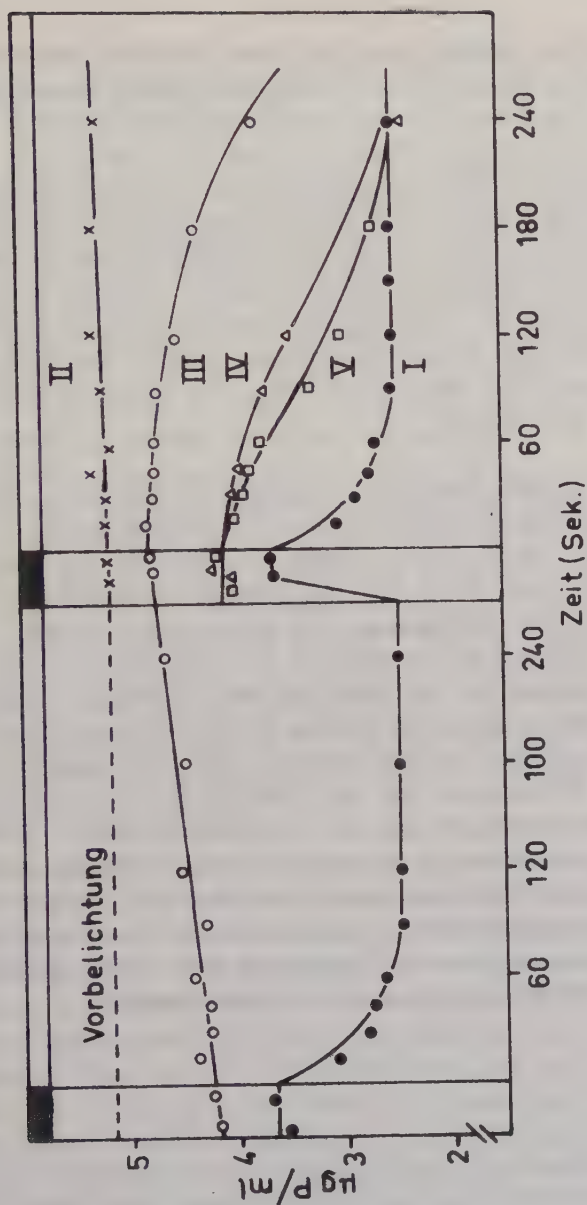


Abb. 29: Der Einfluß verschiedener Lichtintensitäten und einer Vorbereitung auf den anaeroben Pa-Abfall

de, lag der Schluß nahe, daß eine Erhöhung der Lichtintensität zu einer Aufhebung der Hemmung beim rein anaeroben pa -Abfall führt. Aus diesem Grunde wurden Versuche mit 4000 Lux (Kurve IV) und 9200 Lux (Kurve V) durchgeführt. Mit steigender Lichtintensität war eine Zunahme der Phosphorylierungsgeschwindigkeit unter N_2 zu beobachten. Eine zunehmende Unempfindlichkeit der cyclischen Systeme in vitro gegenüber Erhöhungen der Lichtintensität wurde für CCCP von De Kiewiet et al. (1965) und für FCCP, Methylamin, Atebrin und Gramicidin S von Avron und Shavit (1965) an ganzen Chloroplasten beobachtet.

In vivo-Untersuchungen mit Hilfe der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation bestätigen diese Befunde (Tanner et al. 1969) durch eine Verschiebung der Lichtsättigung unter FCCP zu höheren Intensitäten. Unter anaeroben Bedingungen ist demnach bei Ausschaltung einer experimentell bedingten Schichtdickenabnahme mit einer dauerhaften und gleichmäßigen Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung zu rechnen. Bei Zusatz von CO_2 besteht die Möglichkeit, daß eine unempfindlichere ATP-Bildung als die über das cyclische System zur verzögerten Abnahme des pa -Gehaltes führt. Hinweise auf eine unter 2. vertretene lichtabhängige Inaktivierung von FCCP, eventuell über eine SO_4^{2-} -Reduktion wurden nicht gefunden, insbesondere, da auch nach Photosynthesemessungen am Oxygraphen eine Atmungskoppelung im Dunkeln festgestellt werden konnte.

5. Diskussion und Vergleich eigener Befunde mit Ergebnissen anderer Autoren

Untersuchungen an ganzen Chloroplasten haben gezeigt, daß die nichtcyclische Photophosphorylierung gegenüber Carbonylcyanidphenylhydrazon-Derivaten äußerst empfindlich ist. Um die cyclische Photophosphorylierung gleichermaßen zu hemmen, wurde unabhängig vom Cofaktor eine Erhöhung der Entkopplerkonzentration notwendig (Avron u. Shavit, 1963; De Kiewiet et al. 1965).

Bereits Tanner et al. (1969) fanden sowohl an *Chlorella* als auch mit *Scenedesmus* eine Umkehrung der FCCP-Empfindlichkeit beider Phosphorylierungen in vivo.

Die anaerobe, lichtgetriebene Glucoseassimilation als Maß der cyclischen Photophosphorylierung war durch niedrigere Konzentrationen des Entkopplers wesentlich stärker gehemmt als die photosynthetische O_2 -Entwicklung. Eine lichtstimulierte Aufnahme von ^{14}C -Acetat durch *Chlamydomonas reinhardtii* war bei $1 \times 10^{-5} M$ CCCP völlig unterdrückt, während die Photosynthese sogar bei der hohen Konzentration von $1 \times 10^{-4} M$ die gleiche Rate der Sauerstoffentwicklung aufwies wie in der unbehandelten Kontrolle (Hommersand 1963).

Eigene Untersuchungen erbrachten ebenfalls eine, verglichen mit der Photosynthese hohe Empfindlichkeit der lichtgetriebenen Fa -Abnahme unter N_2 in *Chlorella* und zeigen somit gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tanner und Hommersand. Urbach und Gimmler (1969) erzielten dagegen an *Ankistrodesmus braunii* eine gleichartige Hemmung der $^{14}CO_2$ -Fixierung und der ^{32}P -Aufnahme in die organische Phosphatfraktion unter N_2 . Sie schlossen aus ihren Ergebnissen auf eine gleichmäßige Beeinflussung der für beide Photophosphorylierungen identischen hochenergetischen Zwischenprodukte der ATP-Synthese. Der Unterschied zwischen diesen Da-

ten und den Ergebnissen von Tanner et al. (1969), Hommersand (1963) sowie eigener Experimente ist bisher unverstanden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß verschiedene Organismen in unterschiedlicher Weise auf Zusatz von CCP reagieren, wie dies auch von Penth und Weigl (1971) gefunden wurde. Sie wiesen nach, daß in *Limnophila* ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der Zellen und der CO_2 -Fixierungsrate besteht, während in *Chara* unter $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ CCP keine Veränderung des ATP-Pools vorliegt, die Photosynthese jedoch um etwa 30 % erniedrigt ist. Um die Wirkung von Vertretern dieser Entkopplergruppe auf photosynthetische Teilreaktionen genau beschreiben zu können, erscheint es deshalb notwendig, auch andere, am Energiestoffwechsel beteiligte Prozesse zu untersuchen. Solche Experimente waren Gegenstand der weiteren Arbeit.

Eine im Dunkel-Licht-Wechsel unter N_2 auftretende Lag-Phase der Photosynthese wird auf Grund der vorliegenden Experimente durch die Blockierung der cyclischen Photophosphorylierung und damit durch eine verzögerte Auffüllung der phosphorylierten Zwischenstoffpools erklärt. Kaltwasser et al. (1969) berichten von einer etwa 90 Minuten dauernden Lag der Photosynthese in H_2 -adaptierten und mit CCP behandelten *Scenedesmen*. Bis zum Beginn der O_2 -Bildung entwickeln solche Zellen mit Hilfe der im Dunkeln induzierten Hydrogenase unter Beteiligung photosynthetisch aktiver Pigmente im Licht molekularen Wasserstoff, wobei wahrscheinlich gespeicherte Polysaccharide als H-Donatoren dienen. Jedoch erbrachte an *Scenedesmus* die Zugabe von CCP zu bereits aerob Photosynthese treibenden Zellen ebenfalls eine vorübergehende Abnahme der O_2 -Bildung.

Hommersand fand auch an *Chlorella pyrenoidosa* eine Verzögerung der Photosyntheseinduktion nach einem Dunkel-Licht-Wechsel bei mehrstündig aerob unter CCP-Einfluß gehaltenen Zellen. Bei eigenen Untersuchungen war stets nur bei N_2 -Begasung eine Lag-Phase der O_2 -Entwicklung sowie der CO_2 -Fixierung zu verfolgen. Experimente zur genaueren Charakterisierung dieser Photosynthese-Verzögerung an *Chlorella vulgaris* werden ebenfalls im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit berichtet.

Teil C: Messung des RuDP-Spiegels im Dunkel-Licht-Wechsel als Indikator der Auffüllung phosphorylierter Zwischenstoff-Pools und Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Photosynthese-Lag und Energieversorgung der Zelle

Es war vermutet worden, daß eine anfänglich niedrigere Photosyntheserate von einer geringen Poolauffüllung phosphorylierter Zwischenstoffe abhängt. Um Auskunft über die Richtigkeit dieser Arbeitshypothese zu erhalten, sollen nun Konzentrationsänderungen von RuDP im Dunkel-Licht-Wechsel unter FCCP-Einfluß gemessen werden. Die Bestimmung von RuDP wurde ausgewählt, da es sich bei diesem Zwischenstoff um den unmittelbaren CO_2 -Akzeptor handelt, zu dessen Synthese zudem ATP benötigt wird.

Das Auftreten der Lag-Phase war allein unter N_2 -Begasung zu beobachten. Ihr Erscheinen war durch die Wirkung von FCCP auf die cyclische Photophosphorylierung erklärt worden. Es ist nun die Frage zu klären, ob tatsächlich ein ATP-Mangel in den ersten Minuten nach Belichtung zum Auftreten der Lag führt, oder ob FCCP trotz der Anwesenheit von ATP einen Hemmeffekt auf die Photosynthese ausübt. Um das Vorhandensein von ATP unter den Bedingungen der Lag zu prüfen, wurde die Glucoseassimilation im Dunkel-Licht-Wechsel untersucht.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß das Auftreten der Photosynthese-Lag von der Vorbehandlung der Algen während der Dunkel-Phase mitbeeinflusst wird, d.h., daß der Entkoppler unter N_2 - oder O_2 -Begasung unterschiedlich auf die jeweils energieliefernden Prozesse

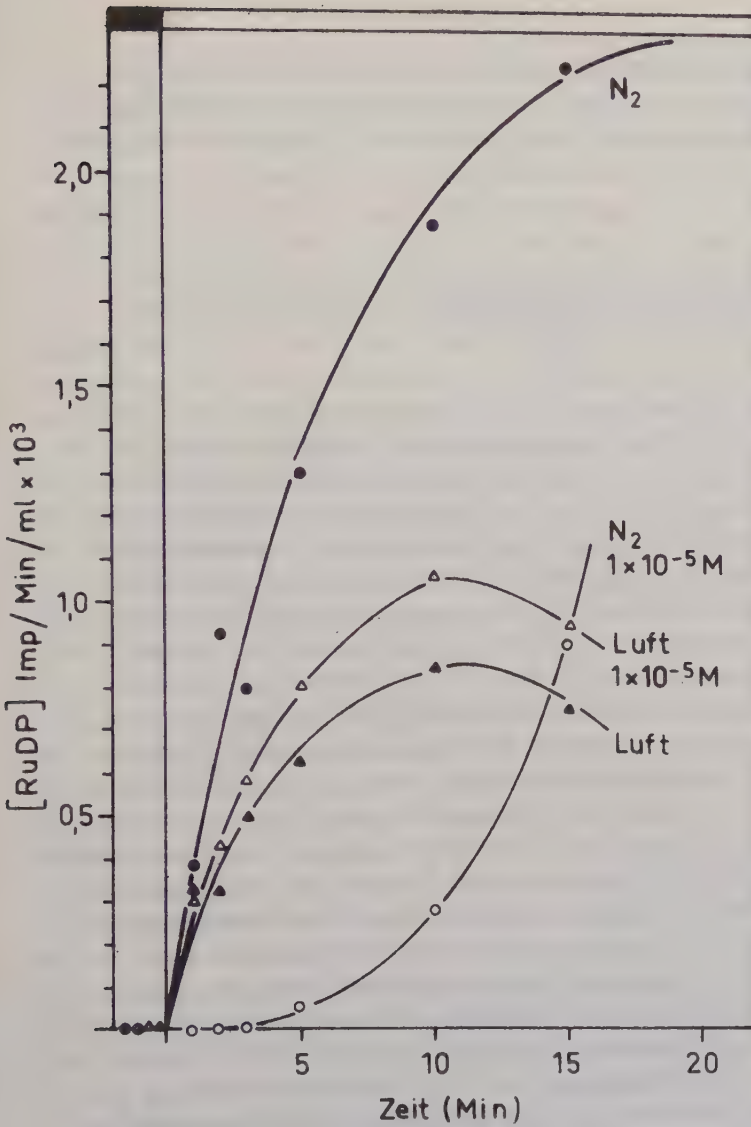


Abb. 30: Einfluß von $1 \times 10^{-5} M$ FCCP auf die RuDP-Bildung in CO_2 -freier Luft und N_2 nach Dunkel-Licht-Wechsel (500 Imp/Min/ml Algensuspension $\hat{=}$ $0,2 \mu M$ RuDP/10 mg Chl. $\hat{=}$ $1 \times 10^{-4} M$)

einwirkt. Um Auskunft über die FCCP-Wirkung auf diese Prozesse zu erhalten, wurden Dunkelatmung, Gärung und Glucoseassimilation in Abhängigkeit verschiedener Entkopplerkonzentrationen erfaßt.

1. Auswirkung der FCCP-Hemmung auf den RuDP-Spiegel in ganzen Chlorellen

Bei Belichtung autotropher Organismen nehmen die im Dunkeln niedrigen Poolgrößen von Zwischenstoffen des reduktiven Pentosephosphatcyclus zu (Kandler u. Haberer-Liesenkötter, 1963; Pedersen et al. 1966/a). Dies betrifft neben Zuckerdiphosphaten und Dihydroxyacetonphosphat insbesondere den unmittelbaren CO_2 -Akzeptor der Photosynthese, das Ribulosediphosphat (Farineau 1969; Strotmann u. Heldt, 1969), dessen Poolgröße nach Verdunkelung nicht oder nur schwer zu bestimmen ist, im Licht jedoch Werte von 3×10^{-4} $\mu\text{M}/\text{mg}$ Chloroplasten-Trockengewicht bei Elodea und $1,4 \times 10^{-3}$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ Chloroplasten-Trockengewicht in Spinat erreicht (Haber et al. 1967/a). In Chlorella wurden Werte von $2 - 3 \times 10^{-4}$ M ermittelt (Kandler u. Haberer-Liesenkötter, 1963). Da die lichtabhängige Bildung des CO_2 -Akzeptors neben der Vorstufe Ru-5-P ATP benötigt, wurde vermutet, daß die durch FCCP bewirkte Blockierung der cyclischen Photophosphorylierung ein Ausbleiben der RuDP-Synthese im Dunkel-Licht-Wechsel zur Folge haben sollte. Untersuchungen hierzu sind in Abb. 30 dargestellt. Unabhängig von der Art der Begasung mit N_2 oder CO_2 -freier Luft war in verdunkelten Chlorella-Zellen kein RuDP nachweisbar. Bei Einstrahlung von Licht steigt der Gehalt des CO_2 -Akzeptors trotz Abwesenheit von exogener Kohlensäure ohne Verzögerung an, wobei unter N_2 -Atmosphäre eine höhere Bildungs-

rate als bei Luftbegasung erzielt wurde. Dieses Ergebnis steht qualitativ in guter Übereinstimmung mit in vitro-Untersuchungen. Latzko und Gibbs (1969) erzielten gegenüber O_2 -Begasung eine wesentliche Steigerung der Ribulokinase-Aktivität durch Belichtung von Spinachchloroplasten unter N_2 . Die Zugabe von FCCP mit einer Endkonzentration von $1 \times 10^{-5} M$ in das Versuchsgesäß, das mit der Apparatur zur Bestimmung des Pa-Gehaltes identisch war, führte in N_2 -Atmosphäre zu einer Lag-Phase der RuDP-Bildung nach Lichtgabe. Erfolgte das Experiment in CO_2 -freier Luft, so nimmt trotz Anwesenheit der gleichen FCCP-Konzentration der Pool von RuDP unmittelbar nach Belichtung mit annähernd derselben Geschwindigkeit wie im Kontrollansatz zu. Diese Experimente zur Messung eines einzelnen Zwischenstoffes bestätigen das bereits durch Erfassung der $^{14}CO_2$ -Fixierung und des O_2 -Gaswechsels gefundene Auftreten der Photosynthese-Lag alleine unter N_2 .

Außerdem kann aus den vorliegenden Daten in Anlehnung an die Untersuchungen von Hommersand (1963) die Notwendigkeit eines hohen ATP-Gehaltes der Zellen für den unverzügerten Beginn der Photosynthese gefolgert werden, der unter Einfluß von FCCP nicht erreicht wird. Von Photosystem I gebildetes ATP wird zumindest unter N_2 wie die Auffüllung des RuDP-Pools beweist, beim Einsetzen der Photosynthese zur Erhöhung der Zwischenstoffe herangezogen. Untersuchungen über die Wirkung von CCCP auf die Poolgrößen verschiedener Zwischenstoffe des Calvin-Cyclus wurden nur von Gould und Bassham (1965) durchgeführt. Der Zusatz des Entkopplers zu Photosynthesebetreibenden Zellen erbrachte bei $1 \times 10^{-5} M$ CCCP Poolschwankungen, die denen beim Licht-Dunkel-Wechsel gleichen, d.h., RuDP nimmt in seiner Konzentration sofort ab. Die Beeinflussung der steady-state-Photosynthese, wie sie hier bei $1 \times 10^{-5} M$ gezeigt wurde,

einer Konzentration, die bei den eigenen Versuchsbedingungen ohne Auswirkung blieb, könnte auf die von den Autoren verwendete, niedrige Algenkonzentration zurückzuführen sein.

2. Untersuchungen zur Regulation der RuDP-Bildung in lebenden Zellen

Wie auf Seite 55 bereits gezeigt, unterbinden DCMU-Konzentrationen $> 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ die Photosynthese völlig. Die Tätigkeit der cyclischen Photophosphorylierung erscheint jedoch durch eigene und Beobachtungen anderer Autoren unter denselben experimentellen Bedingungen als gesichert. Eine von Pigmentsystem I alleine bewirkte ATP-Bildung, die zu verschiedenen Assimilationsleistungen der Zellen verwendet werden kann, sollte demnach auch in der Lage sein, Energie zur RuDP-Synthese beizusteuern. Um dies zu überprüfen, wurde die Bildung des CO_2 -Akzeptors im Dunkel-Licht-Wechsel bei Anwesenheit zweier verschiedener DCMU-Konzentrationen untersucht (Abb. 31). Der RuDP-Spiegel in anaerob gehaltenen Chlorellen steigt nach Einsetzen der Belichtung sofort an und erreicht in den Zellen eine Konzentration von $4 \times 10^{-4} \text{ M}$. Die durch CO_2 -Mangel hervorgerufene rasche Akkumulation wird bei Anwesenheit von NaHCO_3 im Medium unterdrückt. Nach 15-minütiger Versuchsdauer betrug die Konzentration hier nur ca. $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ RuDP. Eine anaerobe Anhäufung des CO_2 -Akzeptors wurde bereits von Strotmann und Heldt (1969) an Chlorella und Farineau (1969) an Maisblättern beschrieben. Wird den verdunkelten Algen unter N_2 -Atmosphäre DCMU mit den Konzentrationen $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ oder $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ zugesetzt, so unterbleibt trotz Belichtung mit 8500 Lux Weißlicht eine Zunahme des CO_2 -Akzeptors, obwohl unter identischen Bedingungen

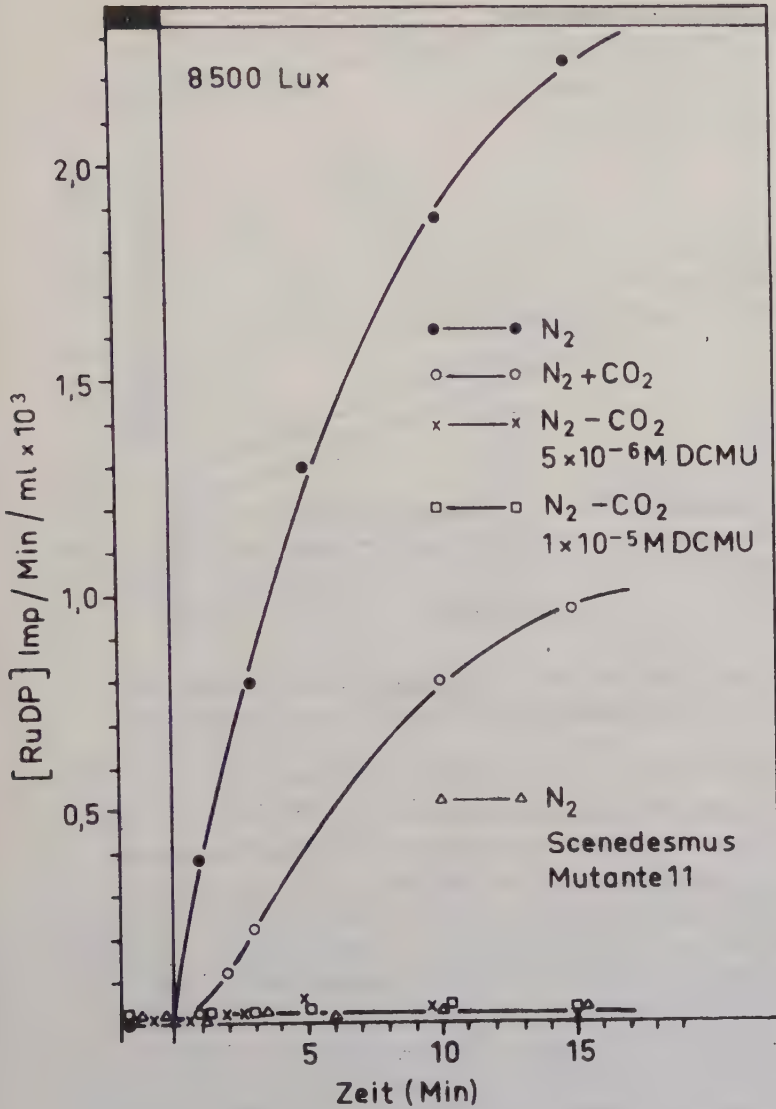


Abb. 31: Einfluß von $5 \times 10^{-6} M$ und $1 \times 10^{-5} M$ DCMU auf die RuDP-Bildung nach Dunkel-Licht-Wechsel

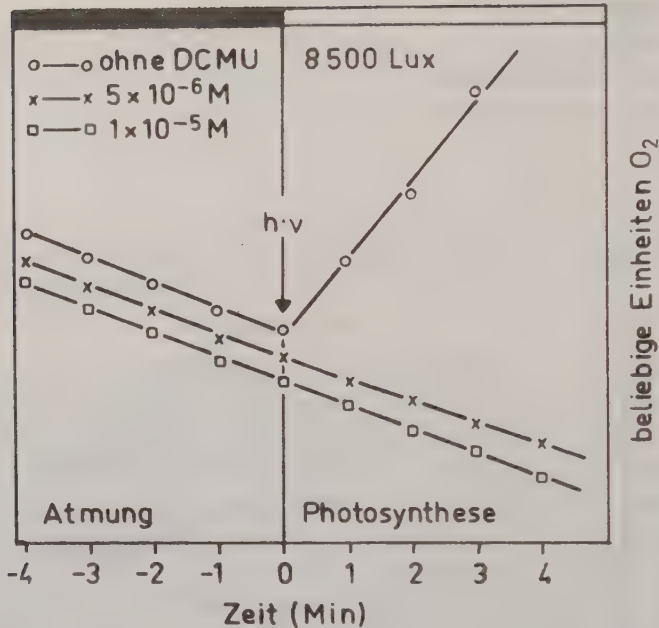


Abb. 32: Einfluß von $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ und $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ DCMU auf die photosynthetische O₂-Entwicklung

der Pa-Abfall in den Algen zu verfolgen war (Abb. 12). Das Verhalten der Photosynthese wurde zum unmittelbaren Vergleich nach Abschluß der Experimente zur RuDP-Bestimmung mit denselben Algen überprüft (Abb. 32). Entsprechend den Erwartungen auf Grund früherer Untersuchungen bewirken beide DCMU-Konzentrationen eine völlige Blockierung der O₂-Produktion. Da DCMU die Reduktion der Pyridinnucleotide verhindert, aber gleichzeitig den ATP-Spiegel erhöht, (Forti u. Parisi, 1963) muß gefordert werden, daß ein durch den Ablauf des nichtcyclischen Elektronentransportes gebildeter Reduktant Einfluß auf die Synthese des CO₂-Akzeptors nimmt. Unter Stickstoff im Licht ohne DCMU sollte dieser Reduktant gebildet werden können.

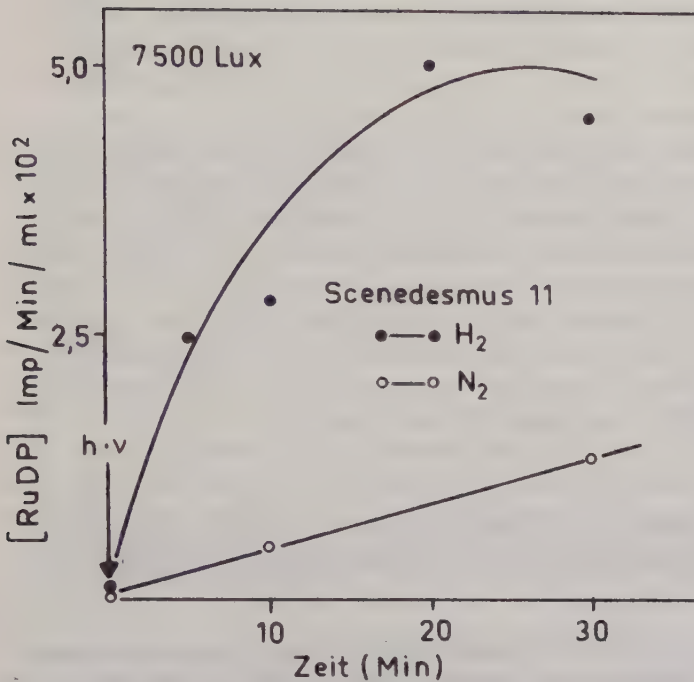


Abb. 33: Vergleich der RuDP-Synthese H_2 -adaptierter Scenedesmus Mutanten Nr. 11 unter H_2 und N_2 -Atmosphäre

Eine Möglichkeit, diese Theorie zu überprüfen, ergab sich bei Verwendung der Scenedesmus Mutante 11, deren Fähigkeit zur ATP-Bildung über die cyclische Photophosphorylierung bereits auf Seite 50 beschrieben wurde. Dieser durch Blockierung der II. Lichtreaktion zur Photosynthese unfähige Organismus führt nach mehrstündiger H_2 -Anpassung eine CO_2 -Fixierung über den Calvin-Cyclus aus, wobei die hierzu benötigten Reduktionsäquivalente im Licht durch die Tätigkeit einer während der Anpassung aktivierten Hydrogenase bereitgestellt werden. Übt ein bei Belichtung in Chlorella

gebildeter Reduktant regulatorische Wirkung auf die CO_2 -Akzeptor-Synthese aus, so sollte auch die nach Bildung der Hydrogenase unter Mitwirkung von Photosystem I zur NADP-Reduktion befähigte Mutante unter H_2 -Begasung RuDP synthetisieren können. Wird aber H_2 durch N_2 ersetzt, also die Bildung des Reduktanten durch Substrat-Mangel der Hydrogenase unterbunden, so sollte keine Zunahme des CO_2 -Akzeptors trotz Anwesenheit ausreichender ATP-Mengen zu beobachten sein. Der im Warburgapparat durchgeführte und in Abb. 33 dargestellte Versuch unterstreicht die Richtigkeit obiger Überlegung. Eine RuDP-Akkumulation ist in Mutante 11 nur unter H_2 -Atmosphäre und nach etwa 4-stündiger Adaptation im Licht zu verfolgen.

3. Diskussion der Regulationsversuche und Vergleich eigener Ergebnisse mit denen anderer Autoren

Pedersen et al. (1966/b) zeigten einen von Belichtung oder Verdunkelung nahezu unabhängigen Ru-5-P- und R-5-P-Spiegel in Chlorella. Der RuDP-Gehalt dieser Zellen nahm dagegen nach einem Licht-Dunkel-Wechsel schnell ab. Da der ebenfalls gemessene ATP-Gehalt der Zellen nach einigen Minuten Dunkelheit etwa gleich hoch lag wie bei Belichtung, schlossen die Autoren auf die Existenz eines Kontrollmechanismus für die Umwandlung von Ru-5-P zu RuDP. Gould und Bassham (1965) studierten ebenfalls die Einwirkung von DCMU auf photosynthetisch CO_2 -fixierende Chlorellen. Die Zugabe des Hemmstoffs während der Lichtperiode (Endkonzentration $1 \times 10^{-5} \text{M}$) bewirkte Poolschwankungen der Zwischenstoffe des Calvin-Cyclus, wie sie auch im Licht-Dunkel-Wechsel erzielt worden waren. Der RuDP-Gehalt sinkt nach der Gift-Zugabe sofort ab und bleibt trotz der unter diesen Bedingungen ablaufenden cyclischen Photophosphory-

lierung auf einem konstant niederen Niveau. Die eigenen Befunde stehen in voller Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen.

Gibt man zu CO_2 -assimilierenden Chloroplasten Vitamin K_5 , so wird die nichtcyclische Photophosphorylierung unterbunden, die cyclische jedoch gefördert (Arnon et al. 1955). Der Zusatz von Vitamin K_5 zu lebenden Zellen während der Photosynthese bewirkt eine Zunahme von R-5-P wobei der RuDP-Gehalt sofort auf 0 absinkt (Gould u. Bassham, 1965). Diese R-5-P-Anhäufung zu einer Zeit, die durch eine völlige Blockierung der Photosynthese und zugleich durch einen hohen ATP-Spiegel gekennzeichnet ist, läßt ebenfalls vermuten, daß eine Regulation der zur RuDP-Synthese notwendigen Enzyme vorliegt. Denn es wäre nicht einzusehen, warum R-5-P nicht über Ru-5-P in RuDP umgewandelt und bei Anwesenheit von CO_2 carboxyliert werden sollte.

Weitere Hinweise auf eine Regulation durch Licht ergeben sich aus der Arbeit von Heber et al. (1967/a) an Spinat. Der ATP-Spiegel bei verdunkelten Blättern wird mit $2 \times 10^{-4} \text{M}$ angegeben. Da Hexosephosphat zudem in ähnlicher Konzentration wie im Licht vorliegt und Triosephosphat aus dem Cytoplasma in die Chloroplasten einwandern kann, ist das Ausbleiben der RuDP-Bildung im Dunkeln nur mittels einer Regulation zu erklären. Strotmann und Heldt (1969) und Heldt (1969) bewiesen ebenfalls, daß die bei Verdunkelung unter O_2 ausbleibende RuDP-Bildung in Chlorella nicht auf einen ATP-Mangel in den Chloroplasten zurückgeführt werden kann, da cytoplasmatisches ATP die Chloroplastenmembran passieren kann. Da nach Heber (1967/b) in Chloroplasten mit glykolytischen Reaktionen gerechnet werden kann, sollte eine stete Zulieferung von Substrat für die an der RuDP-Synthese beteiligten Enzyme gesichert sein. Strotmann und Heldt (1969) vermuteten auf Grund

ihrer Ergebnisse, daß vielleicht reduzierte Pyridin-nucleotide an der Regulation beteiligt sind.

In vitro-Experimente an Extrakten aus *Rhodospseudomonas spheroides* und *Rh. rubrum* (Rindt u. Ohmann, 1969) bewiesen, daß die durch AMP gehemmte Aktivität der Ru-5-P-Kinase durch Zusatz von NADH_2 wiederhergestellt werden kann. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen an Spinatchloroplasten gestützt (Ziegler 1971). Die Inkubation beschallter Chloroplasten mit NADPH_2 oder ATP im Dunkeln führt zu einer Aktivierung der Ribulokinase. NAD, NADH_2 und AMP waren jedoch ohne Effekt auf die Enzymaktivität.

Die eigenen, durch Einwirkung von DCMU auf den RuDP-Gehalt ganzer Zellen im Dunkel-Licht-Wechsel erhaltenen Ergebnisse lassen in Übereinstimmung mit den Befunden der aufgeführten Autoren auf die Existenz einer Regulation der RuDP-Bildung schließen. Die Fortführung der Untersuchungen mit H_2 -adaptierten *Scenedesmus*-Mutanten erbrachte in vivo den Beweis für die bereits durch in vitro-Experimente angenommene Beeinflussung der CO_2 -Akzeptor-Synthese durch einen, nur aus dem Ablauf des nichtcyclischen Elektronentransports hervorgehenden Reduktanten.

4. Untersuchungen zur Induktionsphase der Glucose-assimilation

Das Auftreten der Photosynthese-lagphase unter N_2 -Begasung bei Gegenwart von FCCP war als Hemmung der cyclischen Photophosphorylierung gedeutet worden. Die folgenden Versuche sollen nun die Frage beantworten, ob tatsächlich ein ATP-Mangel für die Entstehung dieser Lag verantwortlich ist, oder ob

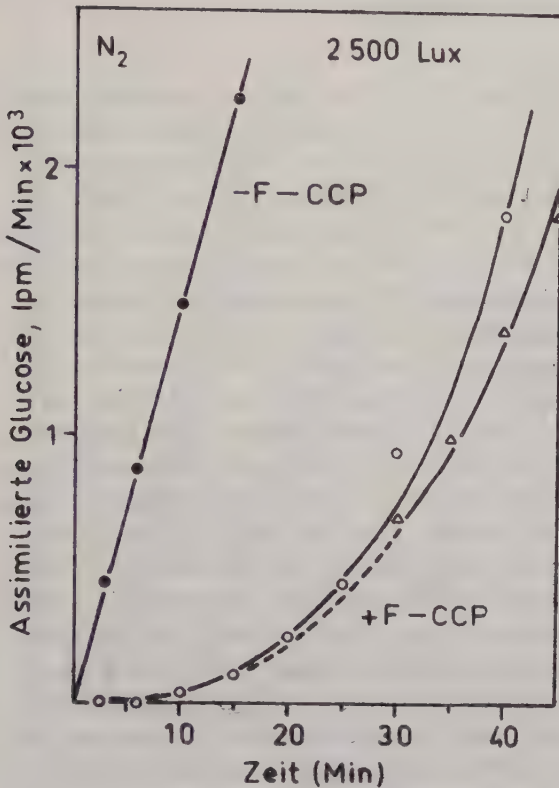


Abb. 34: Einfluß von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP auf die Induktionsphase der Glucoseassimilation nach Dunkel-Licht-Wechsel

- (● - ●) Kontrolle
- (○ - ○) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP
- (Δ - Δ) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP; Probenentnahme ab der 30. Minute

trotz Anwesenheit von ATP unter FCCP-Einfluß eine spezifische Hemmung der Photosynthese vorliegt. Als Indikatorreaktion für die An- bzw. Abwesenheit von ATP wurde die Glucoseassimilation ausgewählt.

4.1. Induktion der Glucoseassimilation unter FCCP beim Dunkel-Licht-Wechsel

Anaerob gehaltene Chlorellen, deren Zuckeraufnahmesystem bereits induziert ist, beginnen unmittelbar nach Einschalten der Beleuchtung mit dem Glucoseeinbau (Abb. 34). War im Versuchsansatz FCCP mit einer Endkonzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ zugegen, so wurde nach dem Dunkel-Licht-Wechsel eine der Photosynthese-Lag gleichende Verzögerung der Hexoseaufnahme festgestellt. Um nun zu überprüfen, ob eine durch die häufige Probenentnahme bedingte Verringerung der Algenschichtdicke und somit eine verbesserte Ausleuchtung der Zellen als Ursache der steten Zunahme der Aufnahmegeschwindigkeit angesehen werden muß, wurden in einem weiteren Versuch Proben erst ab der 30. Minute entnommen. Hierbei zeigte sich, daß die Zellen auch bei gleichbleibender Schichtdicke in der Lage sind, die anfänglich starke FCCP-Hemmung zu überwinden. Die Ursache für die zunehmende Unwirksamkeit des Entkopplers darf deshalb nicht in einer verbesserten Ausleuchtung der Zellen gesehen werden. Die Existenz einer Lag-Phase der Glucoseassimilation beweist den anfänglichen ATP-Mangel in FCCP-behandelten Zellen zu Beginn der Belichtung.

4.2. Vergleichende Untersuchung der Induktionsphase von Glucoseassimilation und Photosynthese

Beide Prozesse laufen unmittelbar nach Belichtung an, wenn kein Entkoppler zugegen ist (Abb. 35). ATP aus der cyclischen Photophosphorylierung ist sofort verfügbar. $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP im Versuchsmedium bewirkt dagegen eine lang anhaltende Verminderung der Zucker-

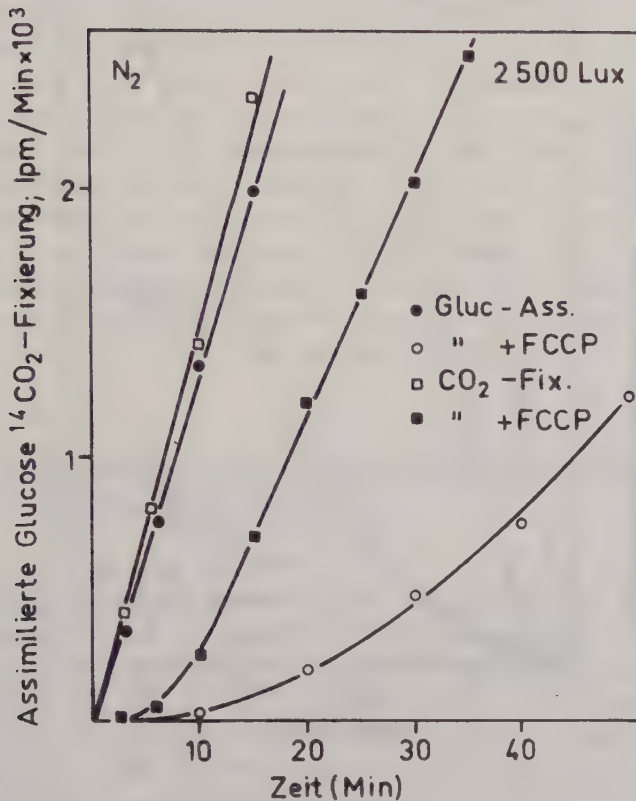


Abb. 35: Vergleich der Induktion von Photosynthese und Glucoseassimilation in Gegenwart von $2 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP

aufnahme, wobei der Lag-Charakter des Kurvenverlaufs durch die stete Zunahme der Assimilationsrate erkennbar bleibt. Die Photosynthese erreicht bereits nach ca. 10 Minuten eine konstante $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungsrate, die um etwa 35 % niedriger liegt als die der Kontrolle. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den auf Seite 86 aufgeführten Daten über den Einfluß

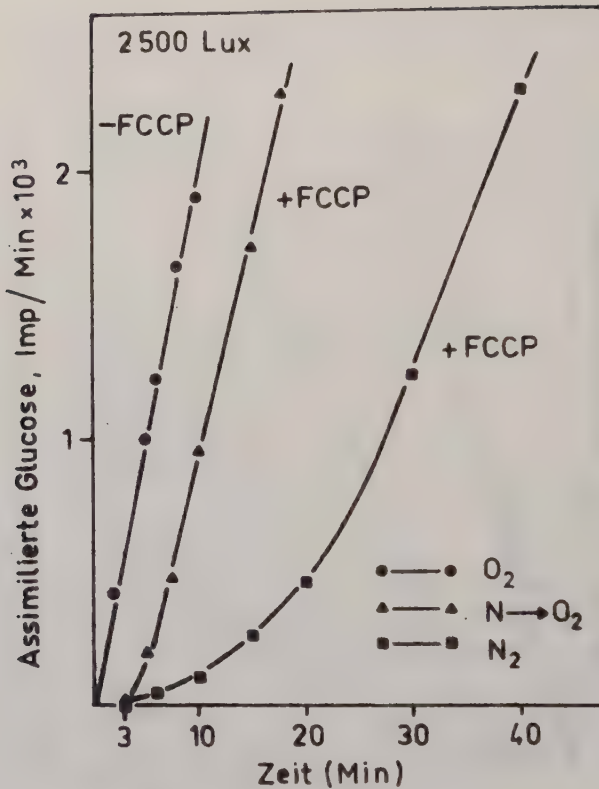


Abb. 36: Aufhebung der Lag-Phase der Glucoseassimilation durch O_2 -Begasung

steigender FCCP-Konzentrationen auf die steady-state-Photosynthese. Auf Seite 76 war auf eine Beschleunigung des anaeroben Pa-Abfalls bei Anwesenheit von $NaHCO_3$ im Versuchsmedium hingewiesen worden. Die unterschiedliche Länge der Lag-Phase von Photosynthese und Zuckeraufnahme bestätigt die Richtigkeit dieses Ergebnisses, da das frühzeitige Erreichen konstanter CO_2 -Fixierungsraten auf eine schnellere Zunahme phos-

phorylierter Zwischenstoffpools und damit auf eine rasche Pa-Abnahme hinweist. Da die cyclische Photophosphorylierung jedoch, repräsentiert durch die Glucoseaufnahme, stark gehemmt erscheint, muß die Frage untersucht werden, auf welche Weise CO_2 zur Verkürzung der Lag-Phase beiträgt. Entweder sollte ATP von der nicht-cyclischen Photophosphorylierung zur allmählichen Poolauffüllung abgezweigt werden können, oder aber eine O_2 -Produktion durch den ungehemmten nichtcyclischen Elektronentransport führt zur Energiegewinnung mittels der oxydativen Phosphorylierung.

4.3. Die Wirkung von O_2 -Zusatz während der Glucose-assimilations-Lag-Phase

Obige Überlegung setzt voraus, daß die Atmung trotz Gegenwart der verwendeten FCCP-Konzentration ablaufen und ATP bilden kann. Ein Versuch zur Überprüfung dieser Frage ist in Abb. 36 dargestellt. Als Kontrollversuch wurde diesmal die Aufnahme von Glucose nach aerobem Dunkel-Licht-Wechsel gewählt. Der sofort einsetzende Zuckereinbau verläuft mit der durchschnittlich 1,4-fachen Rate der Aufnahme unter N_2 im Licht, d.h., in Luft wird etwa 30 % mehr Glucose assimiliert. Wird die Vorbegasung jedoch bei $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP mit N_2 vorgenommen, so erhält man die oben beschriebene Verzögerung der Aufnahme. In einem weiteren Versuchsgefäß wurde das Algenmaterial ebenfalls mit Stickstoff unter derselben Entkopplerkonzentration vorgast, jedoch nach 3-minütiger Belichtungszeit, in der, wie erwartet, keine Glucoseassimilation stattfand, mit Luft durchspült. Wie aus dem Kurvenverlauf ersichtlich, setzt die aerobe Glucoseassimilation nach diesem Wechsel der Begasung

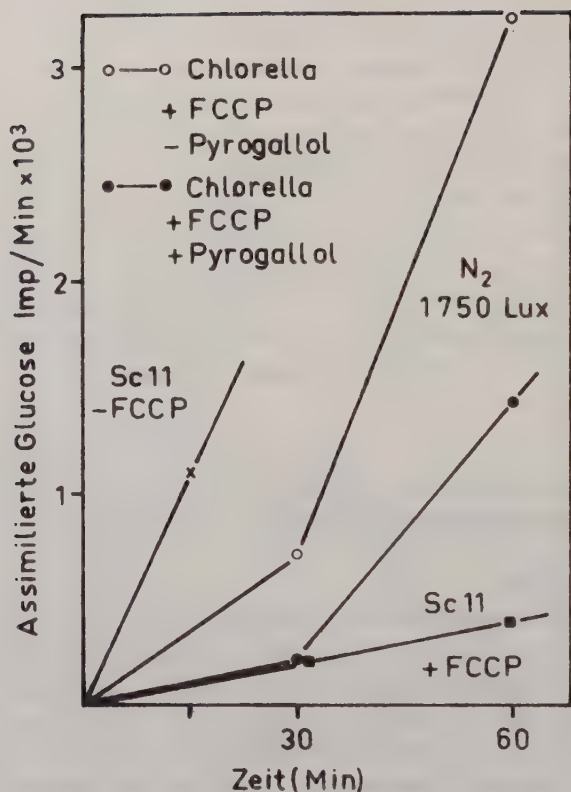


Abb. 37: Nachweis der Beteiligung von O_2 an der Aufhebung der Glucoseassimilations-Lag-Phase

mit nahezu unverminderter Rate ein. Es besteht deshalb die Wahrscheinlichkeit, daß bei Anwesenheit von CO_2 im Versuchsansatz eine bei Belichtung eintretende Wasserspaltung auch unter N_2 -Atmosphäre zur ATP-Produktion durch die Algen führt. Dieses ATP sollte während der photosynthetischen Induktionsphase, die durch den Entkoppler unterbundene Energiezufuhr aus der cyclischen Photophosphorylierung ersetzen können.

4.4. Beteiligung von Sauerstoff an der anaeroben Glucoseassimilation

Da eine langsam einsetzende O_2 -Produktion der Algen im Licht zur Überwindung der Photosynthese-Lag-Phase führte, wurde vermutet, daß auch bei der Aufhebung einer anfänglich niedrigen Rate der Glucoseassimilation endogen gebildetes O_2 beteiligt sein könnte. Aus diesem Grunde wurde die Lag-Phase der Zuckeraufnahme in An- und Abwesenheit von alkalischer Pyrogallol-Lösung untersucht (Abb. 37). Die in Gegenwart des Absorptionsmittels deutlich erniedrigten Aufnahmeraten beweisen, daß unter den zur Glucoseassimilation verwendeten Versuchsbedingungen Sauerstoff in der Zelle entwickelt wird und demnach auch die oxydative Phosphorylierung am Zuckereinbau beteiligt erscheint. Verwendet man die Mutante *Scenedesmus* 11, die nicht zur O_2 -Entwicklung befähigt ist, so wird über die Dauer von 60 Minuten ein konstanter Einbau gemessen. Die Assimilationsrate betrug bei $1 \times 10^{-5} M$ FCCP etwa 10 % der Kontrolle. Diese Experimente legen nahe, daß die cyclische Photophosphorylierung in *Chlorella* noch wesentlich stärker gehemmt wird, als es die für die Glucoseaufnahme unter N_2 im Licht erhaltenen Kurvenverläufe anzeigen.

Ullrich (1971) zeigte, daß synchrone Kulturen von *Ankistrodesmus* unter N_2 Sauerstoff auch in Abwesenheit von CO_2 produzieren können. Diese Sauerstoffentwicklung ist abhängig von einer Nitrat-Reduktion und steht somit in Zusammenhang mit dem nichtcyclischen Elektronentransport. Da bei den eigenen Versuchen ebenfalls ein nitrathaltiges Kulturmedium Verwendung fand, liegt der Gedanke nahe, daß unter reiner N_2 -Begasung ein solcher Mechanismus zur O_2 -Produktion und demnach zur Zuckeraufnahme mit Hilfe der oxydativen Phos-

phorylierung führen kann. Ullrich schloß aus seinen Ergebnissen auf eine niedrige in vivo - Rate der cyclischen Photophosphorylierung von Ankistrodesmus, die nur wenige Prozent der vollen Rate der nichtcyclischen Photophosphorylierung erreicht.

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Kandler über den anaeroben, lichtabhängigen Einbau von Glucose in *Chlorella vulgaris* sind mit den in der vorliegenden Arbeit geschilderten Experimenten nicht direkt vergleichbar. Kandler und Mitarbeiter suspendierten die Algen vor Versuchsbeginn stets in 0,08 M PO_4 -Puffer, pH = 6,5. Eine O_2 -Produktion durch Reduktion von Nitrat unter N_2 -Begasung scheidet hier demnach aus. Eine Lag-Phase der anaeroben Glucoseassimilation konnte somit auch nicht beobachtet werden. In den vorliegenden, eigenen Experimenten war der PO_4 -Puffer zur besseren Vergleichsmöglichkeit aller aufgeführten Versuchsergebnisse durch das bisher stets verwendete PO_4 -freie Kulturmedium ersetzt worden.

5. Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von FCCP auf Atmung, Gärung, Glucoseassimilation und Pa-Niveau der Zelle im Dunkeln

Die FCCP-bedingte Lag-Phase der Photosynthese war nur nach N_2 -Begasung gemessen worden. Untersuchungen zur anaeroben Glucoseassimilation hatten den Mangel an ATP während der ersten Minuten nach Lichtgabe bestätigt. Waren die Algen jedoch während der Dunkelperiode unter Luft-Atmosphäre gehalten, so konnte die CO_2 -Fixierung bei Belichtung stets sofort beginnen. Es besteht somit die Möglichkeit, daß der Einfluß des Entkopplers während der Dunkelperiode auf die unter

N₂ und Luft verschiedenen energieliefernden Prozesse maßgeblich für das Auftreten oder Ausbleiben der Lag verantwortlich ist. Um Aufschluß über die Energieversorgung der Zelle unter FCCP im Dunkeln und den möglichen Zusammenhang mit der Lag-Phase zu erhalten, wurden Atmung, Gärung, Glucoseassimilation und Pa-Gehalt der Zellen in Abhängigkeit verschiedener Entkopplerkonzentrationen im Dunkeln untersucht.

5.1. Die Energieversorgung während der aeroben Dunkelperiode

Messungen des O₂-Gaswechsels verdunkelter Chlorellen erbrachten eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs mit zunehmender Entkopplerkonzentration (Abb. 38). Bei $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ FCCP im Versuchsansatz war der Gasverbrauch bereits auf den 3-fachen Wert der unvergifteten Kontrolle erhöht. Bei $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ wurde die maximale O₂-Aufnahme gemessen. Aus ihr kann ein bis zu 4-fach schnellerer Durchsatz von Elektronen durch die Atmungskette abgelesen werden. Um die Auswirkung dieser Atmungsstimulierung auf die Bereitstellung von ATP für energieverbrauchende Stoffwechselprozesse zu erfassen, wurde die aerobe Glucoseassimilation im Dunkeln unter identischen Bedingungen verfolgt. Die Konzentration von $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ FCCP bewirkte keinerlei Veränderung der Aufnahmegeschwindigkeit, obwohl die gleichzeitig ablaufende O₂-Aufnahme verdreifacht war. Bei $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ wurde eine 20 bis 30%-ige Hemmung des Zuckereinkaufs ermittelt. Dieselbe Konzentration bewirkte nach Tanner et al. (1969) eine Verminderung der Aufnahme um etwa 50 %. Die völlige Blockierung war in eigenen Untersuchungen bei 10^{-4} M FCCP erreicht. Der aerobe, licht-

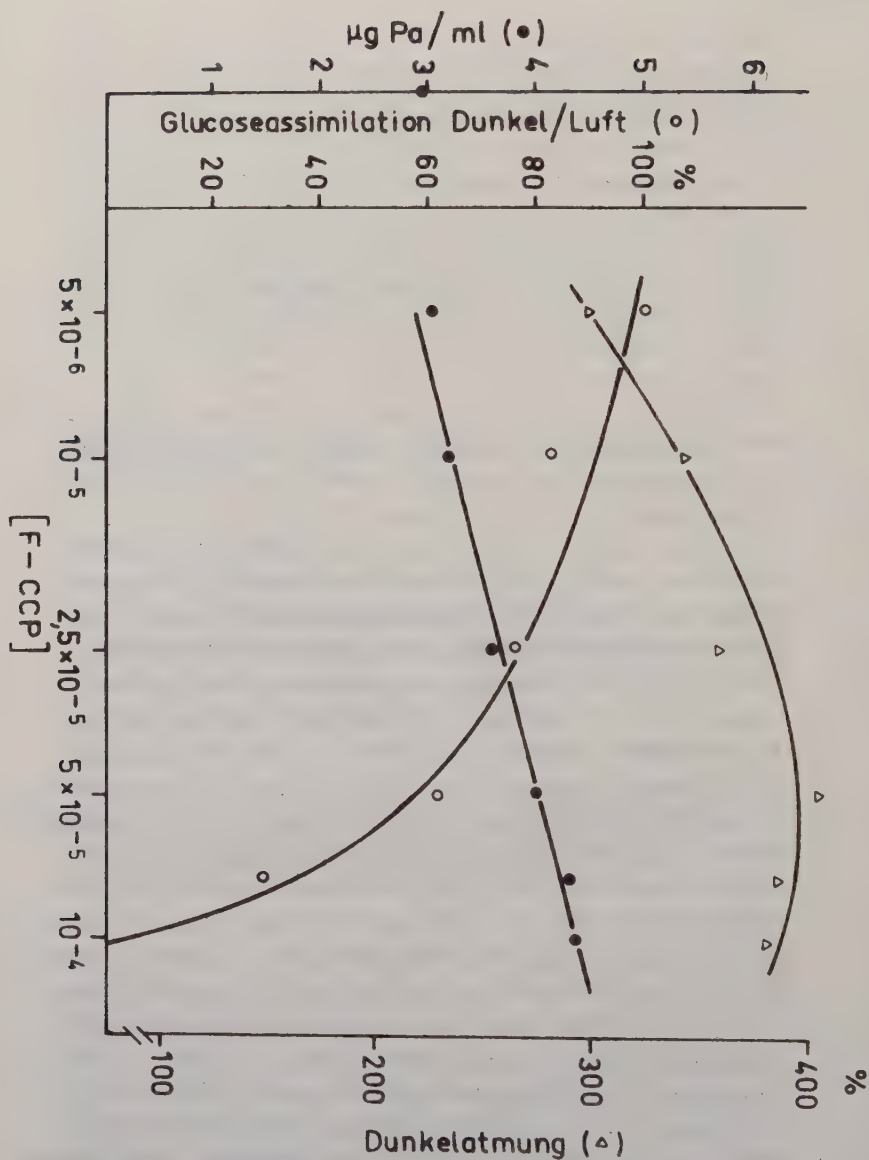


Abb. 38: FCCP-Abhängigkeit von Atmung, Glucoseassimilation und Pa -Niveau in verdunkelten Chlorellen unter O_2

bedingte Pa-Abfall kann als Indikator der Poolauffüllung phosphorylierter Zwischenstoffe erkannt werden. Es sollte deshalb durch Beobachtung des endogenen Phosphatgehaltes unter FCCP-Einfluß die Möglichkeit gegeben sein, Aussagen über die Höhe der Poolauffüllungen zu machen und somit Auskunft über den energy-charge (Atkinson, 1969) der Zelle zu erhalten. Wie aus Abb. 38 hervorgeht, nimmt endogenes Phosphat mit steigender Entkopplerkonzentration zu. Der jedoch bis zu $1 \times 10^{-5} \text{M}$ annähernd gleichbleibende Pa-Gehalt der Zellen läßt auf eine unverminderte Aufrechterhaltung der Konzentrationen phosphorylierter Zwischenstoffe schließen. Erst die Zugabe höherer Konzentrationen läßt den Gehalt des anorganischen Phosphors merklich ansteigen. Bei 10^{-4}M war der Pa-Gehalt der Zelle um etwa 30 % erhöht.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Entkopplerkonzentrationen, die unter N_2 -Vorbegasung im Licht eine Lag-Phase der Photosynthese induzieren, bleiben in einer O_2 -Atmosphäre wirkungslos. Es konnte gezeigt werden, daß trotz 3 bis 3,5-fach höherer O_2 -Aufnahme im Bereich von $5 \times 10^{-6} \text{M}$ bis $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP keine wesentliche Beeinträchtigung der aeroben Glucose-assimilation erfolgt. Demnach sollte unter O_2 bei den verwendeten FCCP-Mengen genügend ATP zum Aufbau der Photosynthese-Pools zur Verfügung stehen. Die Photosynthese selbst ist bei diesen Konzentrationen nicht oder nur geringfügig vermindert. Eine dauernde Bereitstellung der nach Arnon normalerweise durch die cyclische Photophosphorylierung zur Photosynthese zugeführten $180 \mu\text{M}$ ATP/mg Chl./h durch die Atmung, scheitert wegen der vergleichsweise niedrigen Leistung der oxydativen Phosphorylierung aus. Die Aufgabe von At-

mung und cyclischer Photophosphorylierung kann demnach nicht in einer direkten Beteiligung an der CO_2 -Fixierung gesehen werden. Beide Systeme sollten wegen ihrer vergleichbaren Leistungsfähigkeit in vivo nur zur Aufrechterhaltung eines konstanten Energieniveaus in der Zelle bzw. zur Poolsauffüllung beim Start der Photosynthese dienen. Es wird vermutet, daß die Wirkung des Entkoppers unter O_2 zur Aufrechterhaltung der endogenen ATP-Konzentration von einem erhöhten Durchsatz der Glykolyse kompensiert werden kann.

5.3. Energieversorgung während der anaeroben Dunkelperiode

Die Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung radioaktiv markierter Algen unter Stickstoff zeigt eine Zunahme der Gärung mit steigenden FCCP-Konzentrationen. Auch die Summe der übrigen, unter diesen Bedingungen synthetisierten Gärungsprodukte ist stark gefördert. Bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP war die CO_2 -Produktion verdoppelt, die Ausscheidung von Säuren vervierfacht. Dieses Ergebnis über die FCCP-bedingte CO_2 -Freisetzung steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Kaltwasser et al. (1969) an Helium adaptierten Scenedesmen. Die Autoren konnten zeigen, daß markierte Zellen im Dunkeln sowohl CO_2 ausscheiden als auch H_2 über die, während der Helium-Anpassung gebildeten Hydrogenase entwickeln. Bei Gegenwart von $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ CCCP war die H_2 -Entwicklung nahezu völlig unterbunden, die CO_2 -Ausscheidung jedoch auf den 2,5-fachen Wert angestiegen. Außerdem konnte eine Zunahme radioaktiver organischer Verbindungen im Medium beobachtet werden. Diese Daten lassen auf einen CCCP-stimulierten Stärkeabbau und somit auf einen niederen

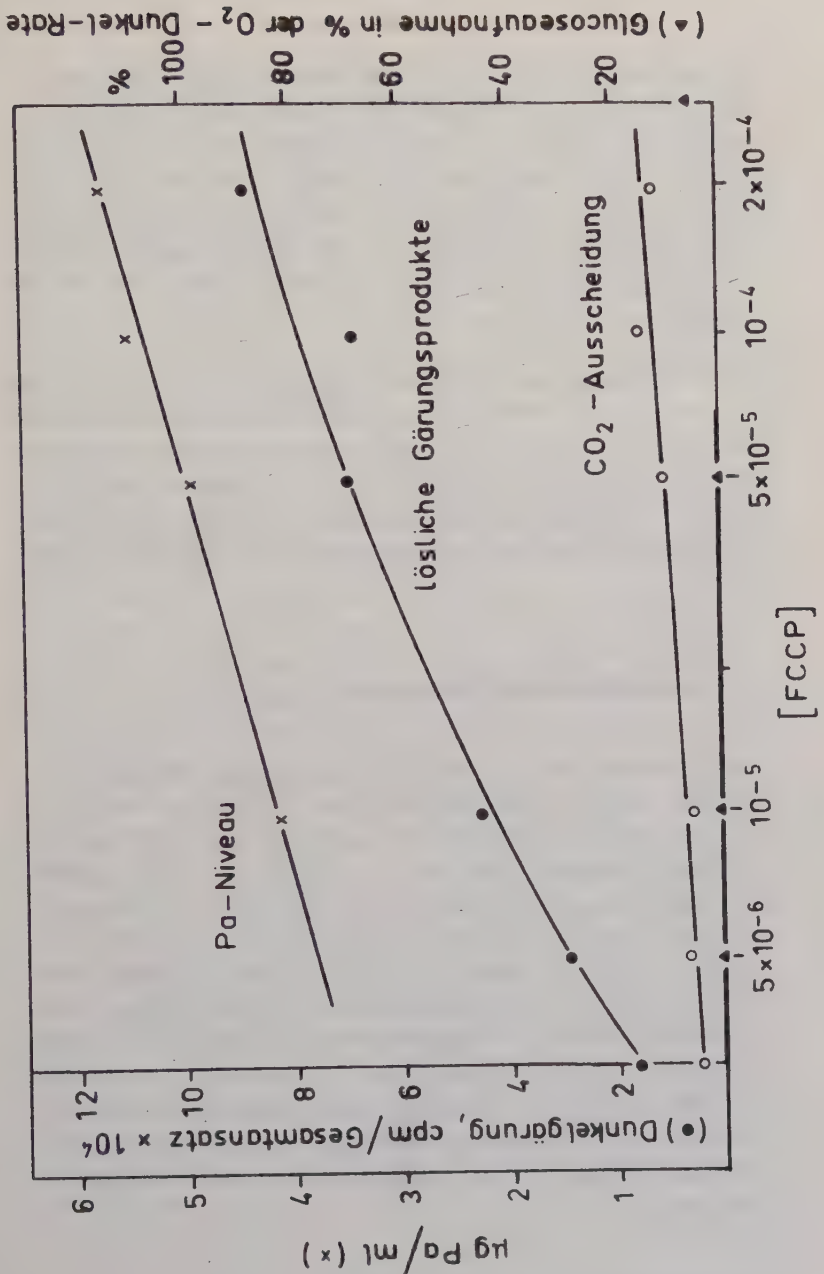


Abb. 39: Einfluß von FCCP auf Gärung und Phosphatgehalt in verdunkelten Chlorellen unter N₂

energy-charge in anaerob gehaltenen Algen schließen. Der ATP-Mangel so behandelter Zellen wird auch bei der Messung der anaeroben Dunkelaufnahme von Glucose bestätigt. Schon ohne Entkopplerzusatz werden nur 5 bis 6 % der unter aeroben Bedingungen eingebauten Glucose aufgenommen. Die Applikation von FCCP-Konzentrationen $\gg 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ führt zu einer völligen Hemmung der Zuckeraufnahme.

Die Bestimmung des anorganischen Phosphats ergab unter N_2 bereits bei $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP eine Phosphatkonzentration, die unter O_2 erst durch Zugabe einer 10fach höheren Entkopplermenge erreicht wurde. Auch dieses Ergebnis zeigt, daß bei $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP unter N_2 eine erhebliche Verschlechterung der ATP-Versorgung in der Zelle eintritt.

5.4. Diskussion der Ergebnisse

Bestimmungen des ATP-Spiegels an Lactuca (Bomsel u. Pradet, 1968) und an Maisblättern (Farineau 1969) erbrachten eine verminderte Energieversorgung der Zellen im Dunkeln unter N_2 . So ergab sich für Lactuca-Keimlinge, die in eine N_2 -Atmosphäre überführt worden waren, ein Zellenergieniveau $E = 0,15$ ($E = \frac{2[\text{ATP}] + [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$; $E_{\text{max.}} = 2$, d.h. 100 % aller Nucleotide der Zelle liegen in Form von ATP vor). Dieser Wert bedeutet, daß von der Gesamtheit der Adenylate etwa 1 % auf ATP und ca. 95 % auf AMP entfallen. An Weizenkeimlingen wurde unter identischen Bedingungen ein Wert von 0,5 bestimmt. Hierbei liegen 5 % der Adenylate als ATP, 55 % als AMP vor.

Die ATP-Konzentration in Maisblättern unter N_2 liegt im Dunkeln bei 14 nM/mg Chl., nach O_2 -Begasung bei 29 nM/mg Chl. Für AMP ergaben sich Werte um 23 bzw. 8,6 nM/mg Chl. (Farineau 1969). Eine Erhöhung des endogenen Pa-Spiegels, die zwangsläufige Folge einer solchen ATP-Abnahme und der Verminderung phosphorylierter Zwischenstoffe, wurde in eigenen Experimenten mehrfach bestätigt. Die geringe Glucoseassimilation unter N_2 im Dunkeln spricht ebenfalls für eine verminderte Energieversorgung.

Der Zusatz von FCCP unterbindet die Zuckeraufnahme völlig und erhöht den zellinternen Pa-Spiegel nochmals bei gleichzeitiger Zunahme der Glykolyserate. Daraus kann auf eine weitere Verschlechterung der Energiezulieferung nach Zugabe des Entkopplers geschlossen werden. Die Befunde sprechen zudem für eine gesteigerte ATP-ase-Wirkung unter FCCP wie sie bereits Heytler (1962) an Mitochondrien nachwies. Die Erhöhung des Glycolysedurchsatzes wäre unter Mitwirkung dieser FCCP-stimulierten ATP-ase als Pasteur-Effekt aufzufassen. Vergleicht man die unter CCP im Dunkeln vorliegenden Ausgangsbedingungen der Photosynthese, so bewirkt Sauerstoff eine für die Auffüllung phosphorylierter Zwischenstoff-Pools ausreichende ATP-Zulieferung, während bei N_2 -Begasung die Zelle an energiereichen Verbindungen stark verarmt. Unter einem solchen Energiemangel erwiesen sich die energieverbrauchenden Enzyme, wie sie bei der Glucoseassimilation und der Photosynthese beteiligt sind, als gehemmt, die Enzyme der Energiebildung aber als gefördert. (Atkinson 1969) Eine Lag-Phase ist demnach, wie auch durch die Experimente bewiesen, insbesondere in einer N_2 -Atmosphäre zu erwarten.

Bei Belichtung der Zellen unter N_2 beginnt die cyclische Photophosphorylierung mit der Synthese energiereicher Bindungen. Die durch Licht zusätzlich erschlossene Energiequelle verschiebt das ATP/AMP-Verhältnis zugunsten des energiereicheren ATP und begünstigt die Seite des Energieverbrauchs. Messungen des ATP/AMP-Quotienten an Mais ergaben im Dunkeln unter N_2 einen Wert von 0,6 und bei Einstrahlung von 13000 Lux einen Wert von 14,6 (Farineau 1969). Die Verwendung dieses ATP-Überschusses wird, wie in eigenen Experimenten durch die sofortige RuDP-Bildung nachgewiesen, zur Auffüllung der für die Photosynthese notwendigen Zwischenstoff-Pools verwendet. Die Zugabe von CO_2 führt deshalb auch unter N_2 zum sofortigen Einsetzen der CO_2 -Fixierung.

Unter Stickstoff im Dunkeln scheint bei Gegenwart von FCCP die Energieversorgung, wie aus dem weiter erhöhten Pa-Niveau und der völlig unterbundenen Glucose-assimilation ersichtlich, noch ungünstiger zu sein, als in Abwesenheit des Entkopplers. Beim Einschalten von Licht wird die normalerweise zu diesem Zeitpunkt einsetzende cyclische Photophosphorylierung stark gehemmt. Das Ansteigen von ATP erscheint verzögert oder weitgehend blockiert. Die Zwischenstoff-Pools der Photosynthese können demnach ebenfalls nur zögernd zunehmen. Durch dieses Verhalten erscheint bewiesen, daß zumindest unter N_2 die cyclische Photophosphorylierung am Anlaufen der Photosynthese beteiligt sein muß.

An Chlorella war bei Begasung mit nachgereinigtem N_2 im Licht eine allmähliche Zunahme der Zuckerassimilation beobachtet worden, deren Zusammenhang mit endogen durch die Zelle produziertem O_2 nachgewiesen werden konnte. Da FCCP den nichtcyclischen Elektronentrans-

port bei den gewählten Konzentrationen nicht beeinflußt, besteht die Möglichkeit einer pseudocyclischen Photophosphorylierung oder aber der durch die Wasserspaltung freigesetzte Sauerstoff wird von der ebenfalls funktionsfähigen oxydativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung ausgenützt. Eine fortwährende O_2 -Freisetzung könnte durch die in einzelligen Algen stattfindende und von beiden Lichtreaktionen gemeinsam betriebene Nitratreduktion in Gang gehalten werden (Ullrich 1971).

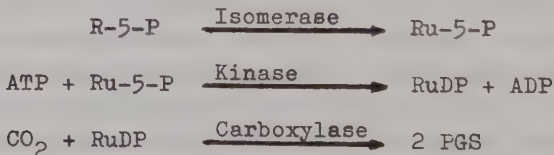
Die Zugabe von CO_2 unter N_2 bedeutet die Bereitstellung eines Elektronen- und Protonen-Akzeptors für die ungehemmte nichtcyclische Bildung von Reduktionsäquivalenten, vorausgesetzt, der unmittelbare CO_2 -Akzeptor, RuDP, ist in ausreichendem Maße in der Zelle vorhanden. Dies ist jedoch unter FCCP beim Dunkel-Licht-Wechsel nicht der Fall. Die kürzere Lag-Phase der Photosynthese, verglichen mit der Glucoseassimilation könnte für eine raschere Zunahme des RuDP-Pools bei CO_2 -Anwesenheit sprechen. Es darf daher spekuliert werden, daß unter N_2 mit CO_2 die Wasserspaltung durch den nichtcyclischen Elektronentransport beschleunigt wird, da die gebildeten reduzierten Pyridinnucleotide auch verbraucht werden können. Eine vermehrte O_2 -Entwicklung könnte, im Sinne einer Aufschaukelung, auch zu einer rascheren ATP-Bildung über die Atmung und damit verbunden zu einer beschleunigten Auffüllung der Photosynthese-Pools führen. Auf diese Weise wäre eine Umgehung der normalerweise in der Induktionsphase der Photosynthese unter N_2 zur Poolauffüllung herangezogenen, aber durch FCCP gehemmten cyclischen Photophosphorylierung möglich.

Teil D: Hemmung der Photosyntheseinduktion durch Adenylate

Aus Arbeiten an *Rhodospseudomonas spheroides* (Rindt u. Ohmann, 1969), *Thiobazillus neapolitanus* (Mayeux u. Johnson, 1967) sowie *Th. thioparus* (Johnson u. Peck, 1965; Mac Elroy et al. 1968) und *Th. ferrooxydans* (Gale u. Beck, 1966), an *Hydrogenomonas fecalis* (Mc. Fadden u. Tu, 1967), sowie an *Chromatium D* und *Spinat* (Johnson 1966) war bekannt, daß AMP und ADP Einfluß auf die in vitro CO_2 -Fixierungsrate zellfreier Extrakte dieser Organismen nehmen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, daß die Photosynthesehemmung durch ATP-Mangel während der Induktionsphase unter N_2 von einer Regulation durch Nucleotide überlagert ist.

1. Hemmbarkeit der in vitro $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in Chlorella durch AMP

Entsprechend dem von Calvin und Mitarbeitern erstellten Schema wird CO_2 u.a. über folgende Enzymschritte in den Organismus assimiliert:



Eine Hemmung der CO_2 -Fixierung durch Adenylate könnte an der Ribulokinase erfolgen, wie dies an Bakterien nachgewiesen worden war (Mac Elroy et al. 1968; Gale u. Beck, 1966; Mayeux u. Johnson, 1967; Rindt u. Ohmann, 1969). Um diese Befunde für autotrophe Grünal-

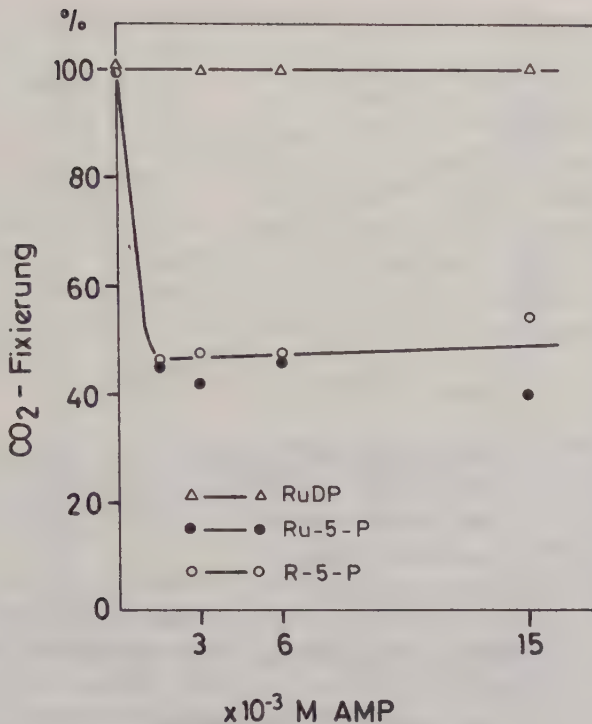


Abb. 40: Der Einfluß von AMP auf die in vitro CO_2 -Fixierung in zellfreien Extrakten von *Chlorella vulgaris* bei Anwesenheit verschiedener Substrate

gen zu bestätigen, wurde der Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ in PGS bei Anwesenheit verschiedener Substrate der Reaktionskette verfolgt (Abb. 40). Die Durchführung dieser Experimente ist in Material und Methodik, Absatz 10, niedergelegt. Wird im Testansatz R-5-P als Akzeptor des CO_2 -Einbaus zusammen mit ATP dem Chlorellaextrakt zugesetzt, so erfolgt in Anwesenheit von CO_2 eine Assimilation der Kohlensäure, d.h. die Enzyme R-5-P-Isomerase, Ru-5-P-Kinase und RuDP-Carboxylase sind wie

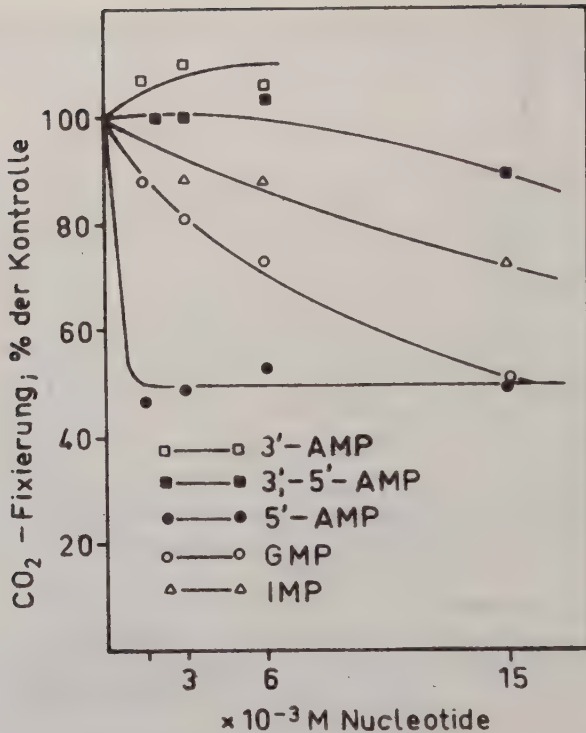


Abb. 41: Mononucleotid-Spezifität der CO_2 -Fixierungs-Hemmung

auch in Bakterien trotz Zerstörung der Zellstruktur funktionsfähig. Die Zugabe von $1,5 \times 10^{-3}$ M AMP (ATP : AMP = 1 : 0,5) erniedrigt die Einbaurrate von CO_2 bereits um etwa 50 %. Eine Erhöhung der Mononucleotid-Konzentration bewirkt keine zusätzliche Abnahme der Fixierung. Bei Ersatz von R-5-P durch gleiche Mengen Ru-5-P, also unter Ausschaltung der R-5-P-Isomerase konnte die gleiche Assimilationsrate wie auch eine identische Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber AMP ermittelt werden. Die Isomerase sollte demnach nicht,

wie von Anderson und Fuller (1969) für *Rh. rubrum* beschrieben, der Nucleotid-Regulation unterliegen. Die Fixierung mit RuDP, dem unmittelbaren CO_2 -Akzeptor erfolgt ohne Behinderung auch bei der hohen AMP-Konzentration von $1,5 \times 10^{-2} \text{M}$. Damit ist bewiesen, daß entsprechend den Befunden an prokaryotischen Organismen auch in *Chlorella* der Ort einer Adenylat-Regulation an der Ribulokinase festgelegt werden darf. Die Empfindlichkeit der CO_2 -Fixierung verweist in der Induktionsphase der Photosynthese auf eine zusätzliche Behinderung durch eine Regulation mittels AMP.

2. Einfluß weiterer Mononucleotide auf die in vitro CO_2 -Fixierung

Chromatophoren aus *Rh. rubrum* katalysieren die Photo-reduktion von NADP zu NADPH_2 (Frenkel 1958), die energieabhängige Transhydrogenierung von NADH_2 zu NADP (Orlando et al. 1966; Keister u. Yike, 1966) sowie die Photophosphorylierung von ADP (Frenkel 1956). Alle aufgeführten Reaktionen wurden von cAMP stärker gehemmt als von AMP (Chaudhary u. Frenkel, 1970). Diese Ergebnisse können als indirekter Hinweis für die regulatorische Beteiligung von cAMP an der Photosynthese in Bakterien angesehen werden. Es war deshalb von Interesse, cAMP und weitere Purin-Nucleotide auf die in vitro CO_2 -Fixierung von *Chlorella* anzuwenden (Abb. 41). AMP hemmt ab $1 \times 10^{-3} \text{M}$ zu 50 %, cAMP bleibt bis zur doppelten Konzentration ohne Einfluß und erreicht erst bei einem Verhältnis von $\text{ATP} : \text{cAMP} = 1 : 5$ eine 10%-ige Erniedrigung der Fixierungsrate. Die Ergebnisse von Frenkel konnten somit an *Chlorella* - Rohextrakten nicht bestätigt werden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nicht geklärt, ob die geringfügige Hemmung von cAMP selbst oder aber durch

eine im Extrakt vorhandene Diesterase-Wirkung, die zur Hydrolyse des cAMP zu AMP führt, verursacht wird.

Ein synthetisches Mononucleotid, 3'-AMP bewirkt eine 5 bis 10%-ige Förderung. Ersetzt man AMP durch das Purin-Nucleotid GMP, so erhält man bei einer Konzentration von $6 \times 10^{-3} \text{M}$ ($\text{ATP} : \text{GMP} = 1 : 2$) eine etwa 25%-ige Hemmung der CO_2 -Fixierung, die bei Erhöhung auf $1,5 \times 10^{-2} \text{M}$ die Hemmung von AMP erreicht. IMP ist noch weniger wirkungsvoll; zu GMP identische Konzentrationen dieses Nucleotids hemmen zu 12 bzw. 30 %. Da der Einfluß beider Nucleotide bei $1,5 \times 10^{-3} \text{M}$ kleiner 10 % war, die AMP-Hemmung hier jedoch bereits den vollen Wert von 50 % erreicht, erscheint die Regulation der Ribulokinase ein adenylatspezifischer Effekt zu sein. An Bakterien und Spinat wurden noch geringere Hemmungen als in den eigenen Versuchen für diese Nucleotide gefunden. In *Th. thioparus* erniedrigt GMP (IMP) bei einem Verhältnis $\text{ATP} : \text{Nucleotid} = 1 : 5$ die CO_2 -Fixierung nur zu 20 (6) Prozent (Johnson u. Peck, 1965), in *Chromatium D* ($\text{ATP} : \text{Nucleotid} = 1 : 2$) zu 20 (3) Prozent sowie in Spinat zu 9 (0) Prozent (Johnson 1966). Diese Ergebnisse beweisen ebenfalls, wie auch die eigenen Untersuchungen die AMP-Spezifität der Ribulokinase-Regulation.

3. Der Einfluß von ADP auf die in vitro CO_2 -Fixierung

An *Chromatium*-Extrakten konnte Johnson (1966) eine 94%-ige Verminderung der CO_2 -Fixierung durch ADP zeigen, wenn R-5-P als Substrat verwendet wurde ($\text{ATP} : \text{ADP} = 1 : 2$). An Spinat belief sich die Hemmung unter identischen Bedingungen auf 84 %. Auch in *Th. neapolitanus* (Mayeux u. Johnson, 1967) sowie

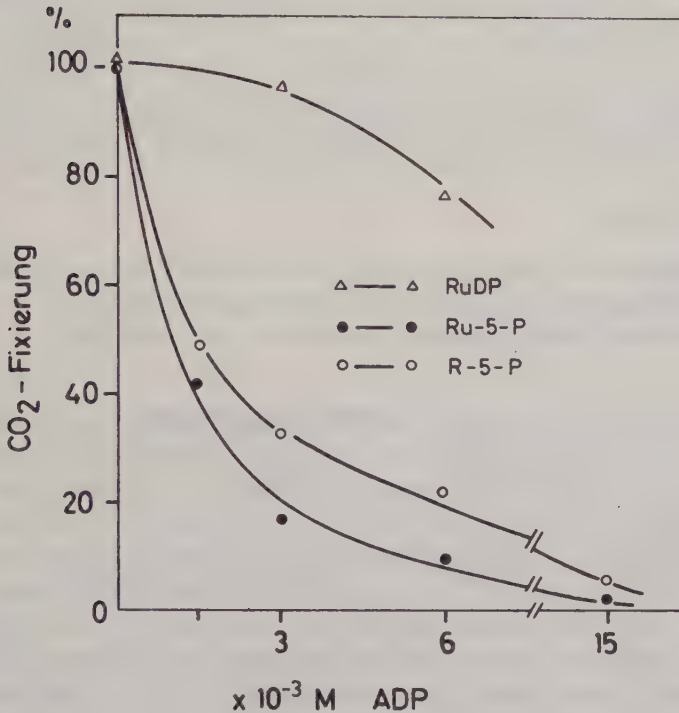


Abb. 42: Einfluß von ADP auf die in vitro CO_2 -Fixierung in Chlorella bei Verwendung verschiedener Substrate

an *H. facilis* war ein Effekt von ADP zu beobachten (Mc. Fadden u. Tu, 1967), wenn die Aktivität der Ribulokinase, nicht jedoch, wenn die der Carboxylase untersucht wurde. Eigene Experimente mit Chlorella-Extrakten sind hierzu in Abb. 42 dargestellt. Die Verwendung von R-5-P und Ru-5-P führt in Gegenwart von 6×10^{-3} M ADP (ATP : ADP = 1 : 2) zu einer ca. 90 bzw.

80%-igen Reduzierung der CO_2 -Assimilation. Die Fixierung mit RuDP als Akzeptor für CO_2 war bei der gleichen ADP-Konzentration nur zu etwa 25 % beeinträchtigt. Aus diesen Ergebnissen an Chlorella kann der Schluß gezogen werden, daß ADP ebenso wie in Bakterien an der Ribulokinase eine regulatorische Funktion ausübt.

Tabelle 5:

Abhängigkeit der ADP-Hemmung von der Mg^{2+} -Ionen-Konzentration

Substrat: R-5-P; Konzentration von ADP $6 \times 10^{-3} \text{M}$

	$\mu\text{M Mg}^{2+}/\text{ml Ansatz}$		
	20	40	60
Kontrolle			
ohne ADP	21550	22082	22263
cpm			
mit ADP	3079	4734	5369
cpm			
% d. Kontrolle	14	22	24

Zweiwertige Ionen, insbesondere Mg^{2+} bilden mit Adenin-Nucleotiden Chelate (Barten 1959). Eine Hemmung der CO_2 -Fixierung wäre deshalb am leichtesten durch eine auf Grund der Chelatbildung erniedrigten Mg^{2+} -Konzentration im Versuchsansatz zu erklären. Aus diesem Grunde wurde die Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung von verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen geprüft (Tab. 5). Die Verdreifachung der Ionenkonzentration erbrachte eine Erhöhung der ungehemmten Assimilationsrate um $< 2 \%$. War $6 \times 10^{-3} \text{M}$ ADP im Ansatz zugegen, so wurden

noch 14 % der ungehemmten Rate gemessen ($20 \mu\text{M Mg}^{2+}$). Der Zusatz von weiteren $40 \mu\text{M Mg}^{2+}$ verringerte die Hemmung nur um 10 %. Es liegt der Schluß nahe, daß unter diesen Bedingungen ausreichend Magnesiumionen verwendet wurden und die Hemmung nicht durch eine Verarmung des Ansatzes an Mg^{2+} mittels Chelatbildung bewirkt wird.

4. Die Wirkung von Pa und PPa auf die in vitro CO_2 -Fixierung

Vose und Spencer (1967) zeigten eine gegenseitige Vertretbarkeit von ATP und PPa als Energiequelle bei der Dunkel- CO_2 -Fixierung in Spinat-Chloroplasten. Auch in Extrakten von *Rps. gelatinosus* stimulierte PPa die Assimilation der Kohlensäure, wobei jedoch etwas niedrigere Raten als mit ATP erzielt wurden (Pflüger u. Bachofen, 1971). Bereits Baltscheffsky et al. (1969) demonstrierten, daß anorganisches Pyrophosphat als biologisch nützliche Energiequelle dienen kann, da es mit einer sogar schnelleren Kinetik als ATP den energieverbrauchenden Elektronentransportschritt vom c-Typ-Cytochrom zum b-Typ-Cytochrom in Chromatophoren von *Rh. rubrum* bewirkt. Experimente mit Oligomycin lassen in diesen Organismen eine direkte Bildung und Verwertung von PPa über $\text{X} \sim \text{I}$, einen noch hypothetischen Zwischenstoff der ATP-Synthese vermuten. Auch in photosynthetisch aktiven Rohextrakten von *Chlorella* wäre demnach eine Synthese von RuDP mit Hilfe anorganischen Pyrophosphats denkbar. PPa hemmt jedoch, wie in Abb. 43 dargestellt, die CO_2 -Fixierung noch stärker als ADP, während Pa ohne jegliche Auswirkung bleibt. In ganzen Spinat-Chloroplasten wird dagegen die lichtabhängige O_2 -Entwicklung durch Erhöhung der Pa-Konzentration völ-

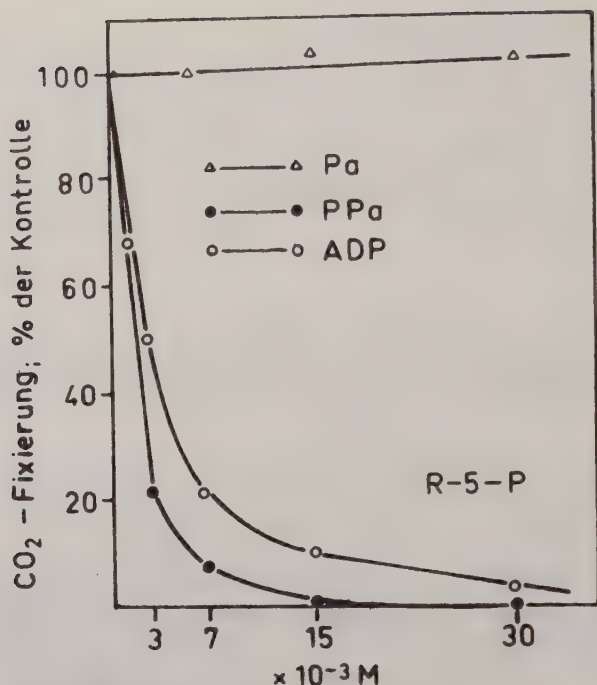


Abb. 43: Einfluß von Pa, PPa und ADP auf die in vitro CO₂-Fixierung in Chlorella-Extrakten
Substrat: R-5-P

lig blockierbar (Cockburn 1969). Dieser Effekt kann aber mit der Existenz des von Heldt und Rapley (1970) beschriebenen Pa-Translokators erklärt werden, durch dessen Tätigkeit dem Chloroplasten PGS im Austausch gegen Pa entzogen und somit die Möglichkeit zur RuDP-Regeneration eingeengt wird. PPa der gleichen Konzentrationen wie Pa bleibt ohne Hemmwirkung auf ganze Chloroplasten, obwohl in vitro-Untersuchungen an verschiedenen Enzymen der CO₂-Fixierung ebenso wie die eigenen Experimente eine deutliche Wirkung von PPa

erkennen lassen (Cockburn 1969). Dieser unterschiedliche Einfluß von PPa auf intakte Chloroplasten und zellfreie Rohextrakte ist bisher unverstanden.

5. Einfluß verschiedener Glykolyse - Zwischenstoffe auf die in vitro CO₂-Fixierung

In prokaryotischen und zur Photosynthese befähigten Organismen sind die Enzyme des Reduktiven Pentosephosphat-Cyclus nicht wie bei höheren Pflanzen in Chloroplasten isoliert, sondern gemeinsam mit den Enzymen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels im Cytoplasma lokalisiert. Es ist zu erwarten, daß verschiedene Zwischenstoffe als Schlüssel für die Regulation der unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen dienen können.

Tab. 6: Wirkung von verschiedenen Glykolyse - Zwischenstoffen und Na-Citrat auf die in vitro-CO₂-Fixierung in Chlorella-Rohextrakten
Substrat: R-5-P; ATP : Zusatz = 1 : 1

Zusatz	% - Hemmung				
	PGS	FDP	F6P	G6P	Na-Citrat
Charge					
I	+18	+ 1	5	4	+ 4
II	+12	9,5	18	8	8
III	+10	11	23	15	11
Ø	+13	7	15	9	5

Kontrollrate: 32822 cpm

Anderson und Fuller (1969) bewiesen die regulatorische Funktion von AMP, ADP und Citrat an der Ribose-5-phosphat-Isomerase. Die bereits oben beschriebenen

Ergebnisse hatten eine allgemeine Gültigkeit dieser Befunde bezüglich der Adenylate sowie des Pa für Chlorella nicht bestätigt. Untersuchungen über den Einfluß von Glykolyse-Zwischenstoffen und Na-Citrat auf die in vitro- CO_2 -Fixierung sollen nun berichtet werden. Die in Tabelle 6 aufgeführten Experimente lassen bei dem gewählten Molverhältnis von ATP : Zwischenstoff = 1:1 keine wesentlichen Abweichungen von den Kontrollraten erkennen. Phosphoglycerinsäure als Zusatz erhöht die Fixierung im Mittel um etwa 13 %, FDP, F6P, G6P und auch Na-Citrat erniedrigen sie um ≤ 15 %. AMP und ADP im gleichen Molverhältnis zugegeben, hatte zu einer Verminderung der Assimilation auf 50 bzw. 20 % geführt. Es dürfte deshalb eine Regulation der CO_2 -Fixierung in Chlorella vorwiegend durch Schwankungen des ATP/AMP oder ATP/ADP-Verhältnisses erfolgen, jedenfalls weit eher als durch Zwischenstoffe der Glykolyse.

6. Untersuchungen über die Aktivierbarkeit des in vitro- CO_2 -Fixierungssystems im Chlorella-Rohextrakt

Ergebnisse aus Teil C der vorliegenden Arbeit hatten eine Aktivierung der RuDP-Bildung durch einen im Licht gebildeten Reduktanten an ganzen Zellen bewiesen. Es war deshalb von Interesse, zu prüfen, ob auch nach Zerstörung der Chloroplastenstruktur im Rohextrakt eine solche Aktivierung des Enzymsystems, eventuell durch NADPH_2 , erzielt werden kann. Rindt und Ohmann (1969) hatten erst nach Zusatz von NADH_2 eine CO_2 -Fixierung in Rps. spheroides-Extrakten erhalten. Eigene Ergebnisse zum Problem der Aktivierbarkeit sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Im Gegensatz zu

Tabelle 7: Einfluß verschiedener NADPH₂-Konzentrationen auf die CO₂-Fixierung

Zusatz	0,25 µM NADPH ₂ /ml	0,50 µM NADPH ₂ /ml	1,00 µM NADPH ₂ /ml
1x10 ⁻³ M mercapto- äthanol	+ 4	10	2
ohne mer- captoätha- nol	+18	+18	+25

Diese Angaben stellen Mittelwerte aus 3 Versuchen dar.

den Befunden von Rindt und Ohmann (1969) ist der Chlorella-Extrakt ohne Zugabe reduzierter Pyridinnukleotide zur Kohlensäure-Assimilation befähigt. Enthält der Extrakt 1x10⁻³M Mercaptoäthanol, so ist bei NADPH₂-Zugabe ein Zunehmen des CO₂-Einbaus von etwa 18 % zu verfolgen, wenn sich die Konzentration auf 0,25 µM NADPH₂/ml Inkubationsansatz beläuft. Die Verdoppelung erbrachte denselben Wert. Aus diesen Daten kann deshalb nicht auf eine NADPH₂-spezifische Aktivierung geschlossen werden. Wurde der Rohextrakt ohne Beigabe von Mercaptoäthanol gewonnen, so war im Bereich von 0,25 bis 1,00 µM NADPH₂/ml des Testansatzes keine signifikante Veränderung der Fixierung aufgetreten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden von Mayeux und Johnson (1967), die an *Th. neapolitanus* ebenfalls keine Aktivierung des CO₂ fixierenden Systems im Rohextrakt nachweisen konnten.

7. Diskussion der Ergebnisse

Die Untersuchungen verschiedener Autoren zum Problem einer Regulation der CO_2 -Fixierung in zellfreien Extrakten führte bei unterschiedlichen Organismen zu quantitativ abweichenden Ergebnissen, obwohl rein qualitativ Übereinstimmung bezüglich der Wirkung von AMP und ADP besteht. In Spinatextrakten (Johnson 1966) verursacht ein AMP/ATP-Quotient von 2 eine 50 bis 60%-ige Hemmung. An *Th. thioparus* (Johnson u. Peck, 1965) führte die gleiche Rate, in *Chromatium D* bereits eine so niedere wie 0,05 (Johnson 1966) zu einer völligen Blockierung. *Th. neapolitanus* und *Th. ferrooxidans* (Gale u. Beck, 1966) nähern sich in ihrer Empfindlichkeit mehr dem Fixierungssystem von Spinat als dem von *Th. thioparus*.

Auch für den ADP-Einfluß wurden abweichende Ergebnisse erzielt. ADP beeinträchtigt die in vitro CO_2 -Assimilation in Spinat stärker als AMP. Bei Verwendung von *Chromatium*-Extrakten wurden umgekehrte Verhältnisse ermittelt (Johnson 1966). Die eigenen Befunde mit *Chlorella*-Extrakten unterstützen die Ergebnisse, die von Spinat berichtet werden. AMP zeigt ab einem ATP/AMP-Verhältnis von 1 : 0,5 und unabhängig von weiteren Erhöhungen der AMP-Konzentration eine gleichbleibende Erniedrigung der CO_2 -Fixierung um ca. 50 %. *Chlorella* ist ebenso wie Spinat empfindlicher gegenüber ADP als gegenüber AMP. Der Vergleich von Ergebnissen verschiedener Autoren legt den Schluß nahe, daß einzelne Organismen mehr von der absoluten AMP-Konzentration, andere mehr von dem Verhältnis der Nucleotide regulatorisch beeinflusst werden. Die alleinige Regulation der CO_2 -Fixierung durch ADP konnte bisher nicht gefunden werden.

IV. Schlußbetrachtung:

Ziel der Untersuchungen über den Einfluß von FCCP auf den aeroben bzw. anaeroben Pa-Abfall und die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung nach Dunkel-Licht-Wechsel war es, Daten über den komplexen Vorgang der Zulieferung von ATP aus der cyclischen Photophosphorylierung zur CO_2 -Assimilation von Grünalgen zu erhalten. Das Auftreten einer Lag-Phase der Photosynthese bei Anwesenheit des Entkopplers in reiner N_2 -Atmosphäre macht eine getrennte Betrachtung der Induktions- und der steady-state-Phase der Photosynthese notwendig.

1. Die Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der Photosynthese-Induktion

Unter Luft-Begasung ohne Zusatz des Entkopplers, also unter physiologischen Bedingungen, wird während der Dunkelperiode ATP durch die Tätigkeit der oxydativen Phosphorylierung für die in der Zelle ablaufenden energieverbrauchenden Prozesse bereitgestellt. Bei Belichtung benötigen autotrophe Organismen zusätzliche Energie für die CO_2 -Fixierung, die von der nichtcyclischen Photophosphorylierung in nicht näher bekannter Form und nach Calvin und Arnon zusätzlich von der cyclischen Photophosphorylierung in Form von ATP in stöchiometrischem Verhältnis zugeliefert werden kann. Die wahrscheinliche Konkurrenz von cyclischer Photophosphorylierung und Atmung um ADP führt während der Belichtung zu einer Erniedrigung der oxydativen Phosphorylierung. Das während der Induktionsphase der Photosynthese für die Auffüllung der Pools phosphorylierter Zwischenstoffe notwendige ATP könnte demnach sowohl aus der cyclischen Photophosphorylierung als auch aus der Tätigkeit der Restatmung stammen.

Wird bereits während der Dunkelperiode FCCP mit einer Endkonzentration von $1 \times 10^{-5} \text{M}$ zugesetzt, so erhöht sich der O_2 -Verbrauch der Atmung auf den 3,5-fachen Wert. Da jedoch Glucose unter diesen Bedingungen mit der gleichen Geschwindigkeit aufgenommen werden kann wie in Abwesenheit des Entkopplers, muß auf eine gleich gute Versorgung des Organismus mit ATP wie unter den physiologischen Bedingungen der Kontrollexperimente geschlossen werden. $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP blockiert jedoch die cyclische Photophosphorylierung, gemessen als anaerober Pa-Abfall nach einem Dunkel-Licht-Wechsel, dauerhaft. Da die photosynthetische CO_2 -Fixierung in Luft bei Gegenwart des Entkopplers nach Belichtung ohne Verzögerung einsetzt, darf vermutet werden, daß ATP aus der alleinigen Tätigkeit der oxydativen Phosphorylierung ausreicht, die zum Ablaufen der Photosynthese notwendigen Pools phosphorylierter Zwischenstoffe zumindest kurzzeitig aufzufüllen.

Bringt man Algen in reine N_2 -Atmosphäre, so ist die Atmung als Energiequelle ausgeschaltet. Während der Dunkelperiode steht dem Organismus nur noch die Substratkettenphosphorylierung als energieproduzierendes System zur Verfügung. Der endogene Pa-Gehalt der Zellen steigt unter diesen Bedingungen auf etwa 150 % des im Dunkeln bei Luft-Begasung gemessenen Wertes an. Die aerobe Dunkelaufnahme von Glucose als Maß der Verfügbarkeit von ATP durch die Zelle wird beim Wechsel der Begasung nach N_2 auf 6 % der ursprünglichen Rate erniedrigt. Sowohl das Verhalten des endogen verfügbaren Pa als auch der Glucoseaufnahme läßt auf eine Verarmung der Zellen an phosphorylierten Zwischenstoffen schließen. Trotz dieser Verarmung an energiereichen Bindungen läuft die Photosynthese bei Belichtung unmittelbar mit maximaler Rate an. Wie aus den

Versuchen zum anaeroben Pa-Abfall nach Dunkel-Licht-Wechsel hervorgeht, ersetzt die cyclische Photophosphorylierung nun die ATP-Bildung durch Substratketten- und oxydative Phosphorylierung. Der nichtcyclische Elektronentransport spaltet bei Belichtung Wasser und entwickelt Sauerstoff, der in steigendem Maße zusätzlich für die Energiegewinnung über die Atmung ausgenutzt werden kann. Die cyclische Photophosphorylierung und die Atmung sind unter Berücksichtigung der zwischen beiden Systemen auftretenden Konkurrenz um ADP auch unter N_2 in der Lage, ATP zur anfänglichen CO_2 -Fixierung beizusteuern. Die trotz fortdauernder N_2 -Begasung in den Zellen herrschenden Bedingungen nähern sich den physiologischen unter Luftatmosphäre.

Die bei Gegenwart von $1 \times 10^{-5} M$ FCCP in den Zellen unter N_2 völlig unterbundene Dunkelassimilation von Glucose und der weiter erhöhte Pa-Gehalt deuten trotz vermehrten Glykolyseumsatzes auf eine weitere Verschlechterung der ATP-Zulieferung. Beim Einsetzen der Belichtung war die Photosynthese nun zumindest anfänglich stark gehemmt, da neben der Substratketten- und der oxydativen Phosphorylierung auch die cyclische Photophosphorylierung unterbunden war. Damit ist eindeutig bewiesen, daß zumindest unter anaeroben Bedingungen ATP aus der Tätigkeit von Photosystem I für die Photosynthese-Induktion erforderlich ist. Trotz Blockierung der cyclischen Photophosphorylierung treten im weiteren Verlauf des Versuches meßbare Mengen O_2 auf, die von der Zelle zur ATP-Synthese über die Atmung herangezogen werden, womit erneut die Möglichkeit besteht, die Pools phosphorylierter Zwischenstoffe weiter aufzufüllen.

Aus der Zusammenstellung dieser Ergebnisse läßt sich ableiten, daß die cyclische Photophosphorylierung in der Photosynthese-Induktion nur notwendig ist, solange die Zellen nicht über Sauerstoff verfügen können.

2. Die Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der steady-state-Photosynthese

Die steady-state-Photosynthese wurde unabhängig von der jeweiligen Begasung mit Luft oder N_2 von $1 \times 10^{-5} M$ FCCP nicht oder nur unwesentlich beeinflusst. Der nicht-cyclische Elektronentransport erscheint demnach trotz Anwesenheit des Entkopplers ungehindert ablaufen zu können. Nach Arnon sind für die Assimilation von $180 \mu M CO_2/mg \text{ Chl.}/h$ etwa $540 \mu M ATP/mg \text{ Chl.}/h$ notwendig, von denen $180 \mu M ATP$ durch die cyclische Photophosphorylierung bereitgestellt werden sollen. Geht man jedoch von der in Teil B der vorliegenden Arbeit bereits diskutierten Annahme aus, daß $1 \times 10^{-5} M$ FCCP die cyclische Photophosphorylierung dauerhaft blockiert, so ist die Frage zu erörtern, aus welchen weiteren Quellen ATP zum ungehinderten Ablauf der CO_2 -Fixierung entnommen werden kann, sofern es hierzu wirklich notwendig sein sollte.

Bei Verwendung niederer Lichtintensitäten könnte in Luftatmosphäre unter FCCP-Einfluß eventuell ATP aus der Atmung für niedere CO_2 -Einbauraten ausreichend sein. Die Erhöhung der Lichtintensität auf für die Photosynthese sättigende Werte führt in Chlorella zu einer 30 - 40-fachen Überkompensation der Atmung. (Kandler 1950) Unter diesen Bedingungen müßte die Photosynthese, folgt man dem Schema von Arnon oder Calvin, bei blockierter cyclischer Photophosphorylierung schnell zum Stillstand kommen. Da sie trotz FCCP-Gegenwart abläuft, könnte auf eine Nichtbeteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der Photosynthese geschlossen werden. Dieser Schluß ist jedoch aus Ergebnissen, die unter FCCP-Beteiligung gewonnen wurden, nicht ohne weiteres zu ziehen, da

Tanner et al. (1969) beweisen konnten, daß die Hemmung der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation durch FCCP an Chlorella bei Erhöhung der Lichtintensität aufgehoben werden kann. Eine Möglichkeit, Aussagen über die Beteiligung der cyclischen Photophosphorylierung an der Photosynthese zu machen, sollte beim Vergleich der gemessenen Raten der ATP-Produktion durch Photosystem I mit dem theoretisch geforderten Wert von $180 \mu\text{M ATP/mg Chl./h}$ gegeben sein. In der vorliegenden Arbeit führte die Bestimmung der Maximalraten mit zwei verschiedenen Methoden, der anaeroben, lichtabhängigen Glucoseassimilation und der anaeroben Pa-Abfall nach Dunkel-Licht-Wechsel übereinstimmend zu etwa $50 \mu\text{M ATP/mg Chl./h}$. Es ergibt sich somit folgenden Gesamtbild:

Auf Grund der vorliegenden Daten über den photosynthetischen CO_2 -Umsatz und das durch die cyclische Photophosphorylierung in vivo maximal beizusteuernde ATP läßt sich eine den Forderungen von Calvin entsprechende Stöchiometrie nur bis zu etwa 25 - 30 % der durchschnittlichen CO_2 -Fixierungsrate aufrechterhalten. Für eine weiter reichende Stöchiometrie sind gegenwärtig keine in vivo-Beweise anzuführen. Sie wäre also überhaupt nur dann denkbar, wenn die bisher angewendeten Meßmethoden zur quantitativen Erfassung der cyclischen Photophosphorylierung in vivo nicht durch Lichtreaktion I selbst, sondern von Transportphänomenen an der Chloroplastenmembran limitiert würden. Damit wären die bisher erzielten Daten als zu niedrig anzusehen. Nur in einem solchen Falle könnte die Hypothese einer stöchiometrischen Beteiligung der cyclischen Phosphorylierung an der CO_2 -Fixierung in vivo auch bis zur vollen Rate von $180 \mu\text{M/mg Chl./h}$ weiterhin aufrechterhalten werden.

V. Zusammenfassung:

1. Die bereits von Kandler (1950) in *Chlorella* nach einem Dunkel-Licht-Wechsel gefundenen Poolschwankungen des endogenen Pa wurden erneut untersucht. Als durchschnittlicher Pa-Gehalt der Zellen unter N_2 -Atmosphäre konnte ein Wert von $5,7 \times 10^{-3} M$ ermittelt werden. Bei Belichtung der Chlorellen nimmt die endogene Pa-Menge rasch ab und erreicht nach etwa 2 Minuten ein konstantes Niveau. Der durch Anlegen einer Geraden an den 15-Sekunden-Lichtwert ermittelte anaerobe PO_4^{3-} -Umsatz belief sich auf ca. $40 \mu M PO_4^{3-}/mg \text{ Chl.}/h$.
2. Die Lichtsättigung des anaeroben Pa-Abfalls bei Einstrahlung von Weißlicht liegt zwischen 1000 und 2000 Lux. Die unter identischen Bedingungen gemessene $^{14}CO_2$ -Fixierung erreicht dagegen ihre Sättigung erst bei 10000 Lux. Die anaerobe Glucoseassimilation, die bereits von Kandler als Testreaktion der cyclischen Photophosphorylierung in vivo erkannt worden war, ist bei ca. 4000 Lux Weißlicht gesättigt. Die im Unterschied zur Photosynthese frühe Lichtsättigung von anaerobem Pa-Abfall und anaerober Glucoseassimilation läßt vermuten, daß auch die Pa-Abnahme unter N_2 von Photosystem I alleine betrieben wird.
3. Im Dunkelrotbereich bei $\lambda = 715 \text{ nm}$ erreicht die Photosynthese nur $1/8$ des Wertes, der bei Einstrahlung derselben Intensität von Licht der Wellenlänge $\lambda = 665 \text{ nm}$ beobachtet wurde. Der anaerobe Pa-Abfall zeigt jedoch bei beiden Wellenlängen und vergleichbarer Lichtintensität identische Kurven-

verläufe. Diese Daten bestätigen erneut die Annahme, daß der Pa-Abfall unter anaeroben Bedingungen nur auf der von Lichtreaktion I betriebenen cyclischen Photophosphorylierung beruht.

4. DCMU hemmt die photosynthetische O_2 -Entwicklung bei Konzentrationen $> 2 \times 10^{-6} M$ zu mehr als 90 %. Die Geschwindigkeit des anaeroben, lichtgetriebenen Pa-Abfalls in Chlorella-Zellen wird bei einer Hemmstoffkonzentration von $2 \times 10^{-6} M$ nur auf etwa 60 % der ungehemmten Anfangsgeschwindigkeit reduziert. Selbst bei der hohen Konzentration von $1 \times 10^{-5} M$ DCMU konnten noch 40 % der Abnahme ermittelt werden. Auch aus diesem Ergebnis kann auf eine Abhängigkeit des anaeroben Pa-Abfalls von Photosystem I geschlossen werden, das erst bei sehr hohen DCMU-Konzentrationen gehemmt wird.
5. Die von Bishop (1962) isolierte Mutante Nr. 11 des Wildstammes *Scenedesmus obliquus* D₃, die keine Möglichkeit zur photosynthetischen Wasserspaltung, aber noch Lichtreaktion I besitzt, weist bei Belichtung eine Pa-Abnahme unter N_2 auf. Da diese Mutante außerdem zu Photoreduktion und anaerober Glucoseassimilation befähigt ist, kann aus dieser Untersuchung ebenfalls auf Photosystem I als Ursache der anaeroben Pa-Spiegel-Schwankungen im Dunkel-Licht-Wechsel geschlossen werden.
6. Die Geschwindigkeit der Pa-Abnahme ist bei N_2 - sowie $N_2 + CO_2$ -Begasung gleich groß. Diese bereits von Kandler an verarmten Zellen festgestellte CO_2 -Unempfindlichkeit konnte erneut, diesmal auch an frisch geerntetem Material, bestätigt werden. Sie verweist wiederum auf die

Zugehörigkeit des Pa-Abfalls zur cyclischen Photophosphorylierung.

7. Der endogene Pa-Gehalt der Zellen unter Luftatmosphäre liegt etwa 30 - 35 % niedriger als bei N_2 -Be-gasung im Dunkeln. Die Geschwindigkeit der aeroben Pa-Abnahme nach Dunkel-Licht-Wechsel bleibt weit hinter der des anaeroben Pa-Abfalls zurück und ist wegen des niedrigen Dunkelniveaus und der geringen Gesamtabnahme nur schwer reproduzierbar. Versuche zur Erstellung einer Lichtabhängigkeit des aeroben Pa-Abfalls zeigten, daß die Lichtsättigungskurve der der photosynthetischen $^{14}CO_2$ -Fixierung sehr ähnlich ist. Diese Übereinstimmung wurde durch Farblichtversuche und DCMU-Anwendung verstärkt. Die Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 715 nm, das eine Abnahme des endogenen Pa unter N_2 bewirkt hatte, ruft unter Luft keine Pa-Spiegel-Schwankungen hervor. Die DCMU-Konzentration von $5 \times 10^{-6} M$ unterbindet sowohl die Photosynthese als auch die aerobe, lichtabhängige Pa-Abnahme völlig.
8. Zusatz von Glucose zu aerob im Dunkeln gehaltenen Chlorellen bewirkt ebenfalls eine Abnahme des endogenen Pa-Gehaltes, die durch zusätzliche Lichtgabe nicht weiter verstärkt werden kann. Aus diesem Experiment läßt sich ableiten, daß der aerobe Pa-Abfall bei Belichtung wahrscheinlich nur die Auffüllung verschiedener Pools phosphorylierter Zwischenstoffe widerspiegelt. Ein direkter Beweis für die Existenz der nichtcyclischen Photophosphorylierung in vivo kann aus dem Ablauf des aeroben Pa-Abfalls nicht gezogen werden.

9. Der Zusatz des Entkopplers FCCP zu anaerob im Dunkeln gehaltenen Chlorellen bewirkt bei Konzentrationen $\geq 6 \times 10^{-6} \text{ M}$ eine völlige Hemmung der Pa-Abnahme beim Dunkel-Licht-Wechsel. Die steady-state-Photosynthese, gemessen als $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung und O_2 -Entwicklung wird von FCCP $< 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ nur unwesentlich beeinflusst. Eine völlige Blockierung der Photosynthese tritt erst bei Konzentrationen $> 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ auf. Messungen der Photosynthese-Induktion unter N_2 nach Dunkel-Licht-Wechsel erbrachten in Gegenwart des Entkopplers eine Lag-Phase der CO_2 -Fixierung. Die Dauer dieser Lag ist abhängig von der Konzentration des Hemmstoffs. Unter Luft-Atmosphäre bewirkt $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP keine Hemmung der Pa-Abnahme. Eine Lag-Phase der Photosynthese konnte unter identischen Bedingungen weder bei der Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung noch bei der O_2 -Entwicklung beobachtet werden.
10. Verwendet man Salizylaldoxim anstelle von FCCP, so wird der anaerobe Pa-Abfall von der Konzentration $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ um mehr als 50 % der Anfangsgeschwindigkeit reduziert, die Photosynthese jedoch im steady-state nicht beeinflusst. Die anaerobe Induktion der Photosynthese weist wie unter FCCP eine Lag-Phase auf. Damit ist bewiesen, daß ein Auftreten einer Lag-Phase keinen FCCP-spezifischen Effekt darstellt.
11. Da eine unter N_2 anfänglich niedere Photosyntheserate auf eine nur geringe Poolauffüllung phosphorylierter Zwischenstoffe schließen läßt, wurden anaerobe und aerobe Konzentrationsänderungen von RuDP im Dunkel-Licht-Wechsel als Indikator dieser Poolauffüllung untersucht. Hierbei zeigte sich, daß unabhängig von der Art der Begasung kein RuDP im Dunkeln nachzuweisen war. In Luft steigt der RuDP-Gehalt der Zellen unmittelbar nach Belichtung rasch an.

Der Zusatz von $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP hatte keinen Einfluß auf die aerobe RuDP-Bildung. Die Geschwindigkeit der RuDP-Synthese ist in H_2 -Atmosphäre höher als unter Luft, da ein Verbrauch des CO_2 -Akzeptors wegen Abwesenheit von CO_2 unterbleibt. Ist $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP im Versuchsansatz enthalten, so zeigt die anaerobe Bildung von RuDP eine der Photosynthese unter diesen Bedingungen entsprechende Lag-Phase. Anfänglich niedrigere Photosynthese-Raten lassen sich direkt auf eine ungenügende Auffüllung von Pools phosphorylierter Zwischenstoffe zurückführen.

12. Als Teilproblem der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Regulation der RuDP-Synthese in vivo durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die DCMU-Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{M}$ neben der photosynthetischen CO_2 -Fixierung auch die Synthese von RuDP völlig unterbindet, obwohl die cyclische Phosphorylierung, gemessen als Pa-Abnahme, in den Zellen unter diesen Bedingungen nur wenig beeinflusst wird. Demnach ist zusätzlich zur ATP-Bildung auch ein im Licht gebildeter Reduktant zur Aktivierung der Ribulokinase nötig. Die Notwendigkeit eines für die RuDP-Bildung erforderlichen Reduktanten konnte durch Verwendung H_2 -adaptierter *Scenedesmus*-Mutanten Nr. 11 in vivo bewiesen werden.
13. Die anaerobe, lichtabhängige Glucoseassimilation weist in $1 \times 10^{-5} \text{M}$ FCCP nach einem Dunkel-Licht-Wechsel ebenfalls eine Lag-Phase auf. Dies spricht dafür, daß ein ATP-Mangel der Zellen zu Beginn der Lichtperiode für die Verzögerung der Photosynthese verantwortlich ist. Da die Lag-Phase der Glucoseassimilation bei gleicher Giftkonzentration län-

ger andauert als die Lag der Photosynthese, wurde vermutet, daß eventuell endogen gebildeter Sauerstoff zur Überwindung dieser Verzögerung beiträgt. Untersuchungen der Induktionsphase der Glucoseassimilation in An- und Abwesenheit von alkalischer Pyrogallol-Lösung ließen eine Erniedrigung der Zuckeraufnahme in Gegenwart des Absorptionsmittels erkennen. Die nicht zu photosynthetischer O_2 -Erzeugung befähigte Mutante Nr. 11 zeigt zudem eine über 60 Minuten linear verlaufende Aufnahme von Glucose bei Gegenwart des Entkopplers. Beide Versuche legen eine Beteiligung von Sauerstoff an der Überwindung der Lag-Phase nahe.

14. Da die Möglichkeit bestand, daß das Auftreten der Lag-Phase von der Vorbehandlung der Algen während der Dunkel-Periode abhängt, wurde der Einfluß von FCCP auf die im Dunkeln energieverzeugenden Prozesse der Algen untersucht.

In Luft-Atmosphäre bewirkt $1 \times 10^{-5} M$ FCCP eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch die Atmung auf 350 %. Die unter identischen Bedingungen gemessene aerobe Glucoseassimilation bleibt durch den Entkoppler nahezu unbeeinflusst. Der endogene Pa-Spiegel der Zellen zeigt bis zu dieser Konzentration keine Erhöhung. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Versorgung der Zellen mit ATP trotz $1 \times 10^{-5} M$ FCCP unter Luft nicht vermindert wird. Es sollte hier demnach während der Induktionsphase der Photosynthese ATP zur raschen Bildung phosphorylierter Zwischenstoffe zur Verfügung stehen.

Unter N_2 im Dunkeln ist der endogene Pa-Gehalt der Zellen um 30 - 35 % erhöht und die Dunkelaufnahme von Glucose auf ca. 6 % der Aufnahme unter Luft erniedrigt. Diese Befunde verweisen auf eine unter N_2

verminderte Energieversorgung sowie auf eine Verarmung der Zellen an phosphorylierten Zwischenstoffen. Die Zugabe von $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ FCCP verdreifacht den Glykolyseumsatz, gemessen als $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung markierter Algen, erhöht das endogene Pa-Niveau zusätzlich und unterbindet die Dunkelaufnahme der Glucose völlig. Es ist demnach mit einer weiteren Verschlechterung der Energieversorgung der Organismen unter dem Einfluß des Entkopplers zu rechnen. Die Auffüllung von Zwischenstoffpools kann im Licht nicht oder nur zögernd erfolgen, da die cyclische Photophosphorylierung ebenfalls von FCCP gehemmt wird. Aus diesen Daten geht hervor, daß zumindest unter N_2 die cyclische Photophosphorylierung am Anlaufen der Photosynthese beteiligt sein muß.

15. Untersuchungen der in vitro- CO_2 -Fixierung an Chlorella-Extrakten zeigten, daß die Hemmung der Photosynthese-Induktion durch ATP-Mangel von einer Nucleotid-Regulation überlagert ist. AMP ($> 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) erniedrigt die CO_2 -Fixierungsrate um 50 %, wenn R-5-P oder Ru-5-P als CO_2 -Akzeptor zugesetzt wird. Bei Zugabe von RuDP konnte keine Hemmung ermittelt werden. $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ADP hemmt die CO_2 -Assimilation mit R-5-P oder Ru-5-P ebenfalls zu 50 - 60 %. Bei Erhöhung der Nucleotid-Konzentration auf $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ nahm die Hemmung auf 80 - 90 % zu. Mit RuDP als Substrat war die CO_2 -Fixierung hier erst auf 75 - 80 % der Kontrollrate erniedrigt. Aus diesen Versuchen darf geschlossen werden, daß Adenylate an der Ribulokinase von Chlorella regulatorische Funktion ausüben.

Anorganisches Phosphat bleibt auch bei der hohen Konzentration von $3 \times 10^{-2} \text{ M}$ ohne Einfluß auf die in vitro CO_2 -Fixierung. PPa hemmt die Testreaktion jedoch in gleichem Maße wie ADP. Glykolyse-Zwischenprodukte wie PGS, F6P, G6P und FDP ($3 \times 10^{-3} \text{ M}$) erniedrigen die CO_2 -Einbaurrate nur zu $\leq 15 \%$.

VI. Literaturverzeichnis:

- Anderson, L.E., and Fuller, R.C.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. III
1618, Ed.: Metzner, H., Tübingen (1969)
- Arnon, D.I.
Nature 167, 1008 (1951)
- Arnon, D.I., Allen, M.B., and Whatley, F.R.
Nature 174, 394 (1954)
- Arnon, D.I., Whatley, F.R., and Allen, M.B.
Biochim. Biophys. Acta 16, 607 (1955)
- Arnon, D.I., Allen, M.B., and Whatley, F.R.
Biochim. Biophys. Acta 16, 605 (1955)
- Arnon, D.I.
Science 122, 9 (1955)
- Arnon, D.I., Allen, M.B., and Whatley, F.R.
Capindale, J.B., and Rosenberg, L.L., Proc. 3rd
Intern. Biochem. Congr., 227 (Brussels, Belgium
1955)
- Arnon, D.I., Whatley, F.R., and Allen, M.B.
Nature 180, 1325 (1957)
- Arnon, D.I., Whatley, F.R., and Allen, M.B.
Science 127, 1026 (1958)
- Arnon, D.I., Tsujimoto, H.Y., and Mc Swain, B.D.
Nature 214, 562 (1967)
- Aronoff, S., and Calvin, M.
Plant Physiol. 23, 351 (1948)
- Atkinson, D.E.
Ann. Rev. Plant Physiol., p. 47 (1969)
- Avron, M.
Biochim. Biophys. Acta 40, 251 (1960)
- Avron, M., and Shavit, N.
in: Photosynthetic Mechanisms in Green Plants
611 (Kok. B., Jagendorf, A.T., Eds., National
Academy of Sciences, National Research Council,
Washington, D.C., Publ. 1145, 1963)

- Avron, M., and Shavit, N.
Biochim. Biophys. Acta 109, 317 (1965)
- Avron, M., and Neumann, J.
Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 137 (1968)
- Baltscheffsky, H., Baltscheffsky, M., and von Ste-
dingk, L.V.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. III
1313, Ed.: Metzner, H., Tübingen (1969)
- Bamberger, E.S., Black, C.C., Fewson, C.A., and
Gibbs, M.
Plant Physiol. 38, 483 (1963)
- Barten, K.
J.Biochem. 71, 388 (1959)
- Benson, A.A., and Calvin, M.
Ann. Rev. Plant Physiol. 1, 25 (1950)
- Bishop, N.I.
Biochim. Biophys. Acta 27, 205 (1958)
- Bishop, N.I., and Gaffron, H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 471 (1962)
- Bishop, N.I., and Weaver, E.C.
Science 140, 1095 (1963)
- Bishop, N.I.
Photochem. Photobiol. 6, 621 (1967)
- Bomssel, J., and Pradet, A.
Biochim. Biophys. Acta 162, 230 (1968)
- Calvin, M., and Massini, P.
Experientia 8, 445 (1952)
- Chaudhary, A.H., and Frenkel, A.W.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 238 (1970)
- Chen, P.S. Jr., Toribara, T.Y., and Warner, H.
Anal. Chem. 28, 1756 (1956)
- Cockburn, W., Baldry, C.W., and Walker, D.A.
Biochim. Biophys. Acta 143, 614 (1967)
- Cockburn, W.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. I
267, Ed.: Metzner, H., Tübingen (1969)

- Davenport, H.E., Hill, R., and Whatley, F.R.
Proc. Roy. Soc. (London) B. 139, 346 (1952)
- Decker, M., und Tanner, W.
in Vorbereitung
- De Kiewiet, D.Y., Hall, D.O., and Jenner, E.L.
Biochim. Biophys. Acta 109, 284 (1965)
- Dilley, R.A., and Vernon, L.P.
Biochemistry 3, 817 (1964)
- Döring, G., Stiehl, H.H., und Witt, H.T.
Z. Naturforschg. 22b, 639 (1967)
- Duysens, L.N.M.
Proc. Roy. Soc. B. 157, 301 (1963)
- Emerson, R., Lewis, C.M.
Am. J. Bot. 30, 165 (1943)
- Emerson, R., Stauffer, J.F., and Umbreit, W.W.
Am. J. Bot. 31, 107 (1944)
- Emerson, R.
Science 125, 746 (1957)
- Fager, E.W.
Arch. Biochem. Biophys. 41, 383 (1952)
- Fager, E.W.
Biochem. J. (London) 57, 264 (1954)
- Farineau, J.
Planta (Berl.) 85, 135 (1969)
- Folin, G., and Wu, H.
J. Biol. Chem. 41, 367 (1920) und 82, 83 (1929)
- Fork, D.C., and Urbach, W.
Proc. Natl. Acad. Sci. US. 53, 1307 (1965)
- Forti, G., and Parisi, B.
Biochim. Biophys. Acta 71, 1 (1963)
- Frenkel, A.W.
J. Biol. Chem. 222, 823 (1956)
- Frenkel, A.W.
Brookhaven Symp. Biol. 11, 276 (1958)
- Freytag, R.
Dissertation München 1958

- Gaffron, H., Fager, E.W., and Rosenberg, J.L.
Symposia Soc. Exptl. Biol. 5, 262 (1951)
- Gale, and Beck, J.V.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 792 (1966)
- Gest, H., and Kamen, M.D.
J. Biol. Chem. 176, 299 (1948)
- Gewitz, H.S., und Völker, W.
Z. Physiol. Chemie 330, 124 (1962)
- Gimmler, H., Urbach, W., Jeschke, W.D., und Simonis, W.
Z. Pflanzenphysiol. 58, 353 (1967)
- Gimmler, H., Simonis, W., und Urbach, W.
Naturwissenschaften 7, 371 (1969)
- Glagoleva, T., and Zalenskii, O.V.
Photosynthetica 4, 15 (1970)
- Good, N., Izawa, S., and Hind, G.
in: Current Topics in Bioenergetics Vol. I, p. 75
Ed.: Sanadi, D.R., Academic Press, New York and
London (1966)
- Goodman, M., Bradley, D.F., and Calvin, M.
J. Am. Chem. Soc. 75, 1962 (1953)
- Gould, E.S., and Bassham, J.A.
Biochim. Biophys. Acta 102, 9 (1965)
- Green, L.F., Mc Carthy, J.F., and King, C.G.
J. Biol. Chem. 123, 447 (1939)
- Gross, E., and San Pietro, A.
Arch. Biochem. Biophys. 131, 49 (1969)
- Grube, K.H.
Planta (Berl.) 42, 279 (1953)
- Heber, U., Santarius, K.A., Hudson, M.A., und Hallier, U.
Z. Naturforschg. 2 b, 1189 (1967/a)
- Heber, U., Hallier, U., und Hudson, M.A.
Z. Naturforschg. 22b, 1199 (1967/b)
- Heber, U.
Biochim. Biophys. Acta 180, 302 (1969)
- Heldt, H.W.
FEBS Letters, Vol. 5, Nr. 1, 11 (1969)

- Heldt, H.W., and Rapley, L.
FEBS Letters, Vol. 10, Nr. 3, 143 (1970)
- Heytler, P.G., and Frichard, W.W.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 272 (1962)
- Hirt, G.
Dissertation München 1972
- Hoch, G., Owens, O.V.H., and Kok, B.
Arch. Biochem. Biophys. 101, 171 (1963/a)
- Hoch, G., and Martin, J.
Arch. Biochem. Biophys. 102, 430 (1963/b)
- Hommersand, M.
in: Photosynthetic Mechanisms in Green Plants,
Publ. Nr. 1145, Nat. Acad. Sci. - Nat. Res. Council
381 (1963)
- Izawa, S.
Biochim. Biophys. Acta 102, 373 (1965)
- Jagendorf, A.T., and Avron, M.
J. Biol. Chem. 231, 277 (1958)
- Jagendorf, A.T.
Brookhaven Symposia in Biol. 11, 236 (1958)
- Jeschke, W.D.
Planta (Berl.) 73, 161 (1967)
- Jeschke, W.D., und Simonis, W.
Planta (Berl.) 88, 157 (1969)
- Johnson, E.I., and Peck, H.D. Jr.
J. Bacteriol. 89, 1041 (1965)
- Johnson, E.I.
Arch. Biochem. Biophys. 114, 178 (1966)
- Kaltwasser, H., Stuart, T.S., and Gaffron, H.
Planta (Berl.) 89, 309 (1969)
- Kandler, O.
Z. Naturforschg. 5b, 423 (1950)
- Kandler, O.
Z. Naturforschg. 9b, 625 (1954)
- Kandler, O.
Z. Naturforschg. 12b, 271 (1957)

- Kandler, O.
Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 37 (1960)
- Kandler, O., und Haberer-Lisenkötter, I.
Z. Naturforschg. 18b, 718 (1963)
- Kandler, O., und Tanner, W.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 79, 48 (1966)
- Katoh, S., and San Pietro, A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 903 (1966)
- Keister, D.L., and Yike, N.I.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 519 (1966)
- King, E.J.
Biochem. J. 26, 292 (1932)
- Knaff, D.B., and Arnon, D.I.
Biochemistry 64, 715 (1969)
- Kok, B., Gott, W.
Plant Physiol. 35, 802 (1960)
- Kok, B., and Hoch, G.
in: Light and life, p. 397, Ed.: Mc Elroy, W.D.
and Glass, B., John Hopkins Press, Baltimore (1961)
- Kylin, A., and Tillberg, I.
Z. Pflanzenphysiol. 58, 165 (1967)
- Lardy, H.A., and Ferguson
Ann. Rev. Biochem. 38, 991 (1969)
- Latzko, E., and Gibbs, M.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. III
1624, Ed.: Metzner, H., Tübingen (1969)
- Latzko, E., and Gibbs, M.
in: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 1348,
Ed.: Bergmeyer, H.H., Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- Loos, E.
Dissertation München 1967
- Losada, M., Whatley, F.R., and Arnon, D.I.
Nature 190, 606 (1961)
- Losada, M., and Arnon, D.I.
in: Metabolic Inhibitors, Hochster, R.M. and Qua-
stel, I.H., eds., Academic Press, New York (1963)

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and
Randall, R.J.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- Mac Elroy, R.D., Johnson, E.I., and Johnson, M.K.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 678 (1968)
- Mc Fadden, B.A., and Chang - Chu L. Tu
J. Bacteriol. 93, 886 (1967)
- Mac Robbie, E.A.C.
Biochim. Biophys. Acta 94, 64 (1965)
- Mac Robbie, E.A.C.
Australian J. Biol. Sci. 19, 363 (1966)
- Marre, E., Forti, G., Bianchetti, R., and Parisi, B.
in: La Photosynthese, p. 557 (Centre National de
la Recherche Scientifique, Paris, 1963)
- Mayeux, I.V., and Johnson, E.I.
J. Bacteriol. 94, 409 (1967)
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C., and Carnahan, J.E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 448 (1962)
- Myers, J.
J. Gen. Physiol. 30, 217 (1947)
- Orlando, J.A., Sabo, D., and Curnyn, C.
Plant Physiol. 41, 937 (1966)
- Pedersen, T.A., Kirk, M., and Bassham, J.A.
Biochim. Biophys. Acta 112, 189 (1966/a)
- Pedersen, T.A., Kirk, M., and Bassham, J.A.
Physiol. Plant. 19, 219 (1966/b)
- Pentth, B., and Weigl, J.
Planta (Berl.) 96, 212 (1971)
- Pfluger, U.N.
in: II. International Congress on Photosynthesis
Research, Stresa, Italy 1971, Abstracts p. 22
- Pfluger, U.N., and Bachofen, R.
Arch. Mikrobiol. 77, 36 (1971)
- Plengvidhya, P., and Burris, R.H.
Plant Physiol. 40, 997 (1965)
- Renger, G., Vater, J., and Witt, H.T.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 477 (1967)

- Ried, A.
Carnegie Inst. Washington, Year Book 64, 399 (1965)
- Rindt, K.-P., and Ohmann, E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 357 (1969)
- Robison and Martland
Biochem. J. 20, 847 (1926)
- Ruben, S.
J. Amer. Chem. Soc. 65, 279 (1943)
- Rurainsky, H.J., Randles, I., and Hoch, G.E.
FEBS Letters 13, 98 (1971)
- San Pietro, A., and Lang, H.M.
Science 124, 118 (1956)
- San Pietro, A., and Lang, H.M.
J. Biol. Chem. 231, 211 (1958)
- Santarius, K.A., and Heber, U.
Biochim. Biophys. Acta 102, 39 (1965)
- Sauer, K., and Biggins, I.
Biochim. Biophys. Acta 102, 55 (1965)
- Schmidt, A.
Dissertation Göttingen 1968
- Schwartz, M.
Biochim. Biophys. Acta 131, 559 (1967)
- Simonis, W., and Grube, K.H.
Z. Naturforschg. 7b, 194 (1952)
- Simonis, W., und Schwinck, L.
Naturwiss. 40, 245 (1953)
- Strehler, B.L.
in: Phosphorus Metabolism Vol. 2, 492 (Glass, B.
and Mc Elroy, W.D., Eds., John Hopkins Press,
Baltimore, Md., 1952)
- Strehler, B.L.
Arch. Biochem. Biophys. 43, 67 (1953)
- Strotmann, H., and Heldt, H.W.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. III
1131, Ed. Metzner, H., Tübingen (1969)
- Syrett, P.J.
J. Exptl. Botany 17, 641 (1966)

- Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y., and Arnon, D.I.
Proc. U.S. Nat. Acad. Sci. 49, 567 (1963)
- Tanada, T.
Am. J. Bot. 38, 276 (1951)
- Tanner, W., Dächsel, L., and Kandler, O.
Plant Physiol. 40, 1151 (1965)
- Tanner, W., Loos, E., und Kandler, O.
in: Currents in Photosynthesis, ed.: J.B. Thomas
und J.C. Goedheer, Donker, Rotterdam (1969)
- Tanner, W., Zinecker, U., and Kandler, O.
Z. Naturforschg. 22b, 358 (1967)
- Tanner, W., Loos, E., Klob, W., and Kandler, O.
Z. Pflanzenphysiol. 59, 301 (1968)
- Tanner, W., Löffler, M., and Kandler, O.
Plant Physiol. 44, 422 (1969)
- Taylor, F.
J. Exptl. Bot. 1, 302 (1951)
- Tolmach, L.J.
Nature 167, 946 (1951)
- Trebst, A.
Z. Naturforschg. 18b, 817 (1963)
- Trebst, A., und Burba, M.
Z. Pflanzenphysiol. 57, 419 (1967)
- Ullrich, W., und Simonis, W.
Planta (Berl.) 84, 358 (1969)
- Ullrich, W.
in: II. International Congress on Photosynthesis
Research, Stresa, Italy 1971, Abstracts p. 115
- Urbach, W., und Simonis, W.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 39 (1964)
- Urbach, W., und Gimmler, H.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. III
1274, Ed. Metzner, H., Tübingen (1969)
- Urbach, W., und Gimmler, H.
Z. Pflanzenphysiol. 62, 274 (1970)
- Van Rensen, J.J.S.
in: Progress in Photosynthesis Research Vol. III
1769, Ed. Metzner, H., Tübingen (1969)

- Vishniac, W., and Ochoa, S.
Nature 167, 768 (1951)
- Vose, I.L., and Spencer, M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 532 (1967)
- Wassink, E.C., Winternans, J.F.G.M., and Tjia, I.E.
Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc., (C) 54,
41 (1951)
- Weinbach, E.C., and Garbus, I.
Nature 221, 1016 (1969)
- Wessels, I.S.C., and van der Veen, R.
Biochim. Biophys. Acta 19, 548 (1956)
- Whatley, F.R., Allen, M.B., and Arnon, D.I.
Biochim. Biophys. Acta 16, 605 (1955)
- Whatley, F.R., Allen, M.B., Rosenberg, L.L., Capindale, J.B.,
and Arnon, D.I.
Biochim. Biophys. Acta 20, 463 (1956)
- Wiessner, W.
Nature 205, 56 (1965)
- Wiessner, W.
Nature 212, 403 (1966)
- Ziegler, I.
in: II. International Congress on Photosynthesis
Research, Stresa, Italy 1971, Abstracts p. 27

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung der Herren Prof. Dr. O. Kandler und Prof. Dr. W. Tanner am Botanischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für das Interesse und die Unterstützung im Verlauf ihrer Anfertigung.

Für wertvolle Ratschläge und Hinweise, zahlreiche Diskussionen und Anregungen bei allen wissenschaftlichen Fragen sowie für die stete Anteilnahme im persönlichen Bereich gilt Herrn Prof. Dr. W. Tanner mein besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. E. Latzko danke ich für einen vierwöchigen lehrreichen Studienaufenthalt im Chemischen Institut Weihenstephan der TU - München.

Dank schulde ich außerdem all denen, die ihr Interesse am Fortgang der Arbeit bekundeten und den Fortgang durch Diskussionen, Anregungen und Unterstützungen förderten.

Lebenslauf

Am 15. August 1942 wurde ich, Wolfgang G. A. Klob, als Sohn des Oberverwaltungsrates Georg Klob und seiner Ehefrau Josefine, geb. Kilger, in Augsburg geboren.

Von 1948 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Augsburg und trat 1953 in das Staatliche Realgymnasium Augsburg über. Dort legte ich im Juli 1962 die Reifeprüfung ab. Im Oktober 1962 wurde ich zur Ableistung des militärischen Grundwehrdienstes nach Fürstenfeldbruck eingezogen. Im Jahre 1964 erfolgte der Besuch der Offizierschule Neubiberg bei München. Ende September 1964 schied ich als Leutnant d. R. aus der Bundeswehr aus.

An der TU München begann ich im Wintersemester 1964/65 mit dem Studium der Fächer Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien. Im Frühjahr 1969 legte ich das Staatsexamen in den o. a. Fächern ab.

Anfang Juni 1969 begann ich unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kandler und Prof. Dr. W. Tanner am Botanischen Institut der Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Am gleichen Institut war ich vom 1. September 1969 bis 31. Dezember 1970 als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt.

Im September 1971 wurde ich als Studienreferendar dem naturwissenschaftlichen Seminar am Max Planck Gymnasium in München zugeteilt. Seit 1. Februar 1972 befinde ich mich im Zweigschuleinsatz am math.-naturwissenschaftlichen Gymnasium in Friedberg bei Augsburg.

Seit August 1969 bin ich mit der Lehrerin Irmtraut Klob, geb. Marzari, verheiratet. Unser Sohn Christian wurde am 18. 1. 1972 in Augsburg geboren.

